

DIE ROLLE DER APIKALEN MEMBRAN
IN DER FUNKTIONSWEISE DER HAARZELLEN
IN DEN FREIEN NEUROMASTEN DES AALES
(*Anquilla anquilla*)

Michaela Baumann

Dess
München
1985



Die Rolle der apikalen Membran in der Funktionsweise
der Haarzellen in den freien Neuromasten des Aales
(*Anguilla anguilla*)

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Michaela Baumann

1. Berichterstatter: Prof.Dr.A.Roth
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr.rer.nat.habil.R.Weiler

Tag der mündl. Prüfung: 17.Juli 1985

1.	Einleitung	3
2.	Material und Methoden	10
2.1.	Präparation	11
2.2.	Versuchsanordnung	14
2.3.	Ableitung	18
2.3.1.	Nervenableitung	18
2.3.2.	Hautableitung	21
2.4.	Reizung	22
2.4.1.	Mechanische Stimulation	22
2.4.1.1.	Strömungsreize	23
2.4.1.2.	Erschütterungsreize	25
2.4.2.	Elektrische Stimulation	29
2.5.	Hautpotentialmessung	30
2.6.	Kühlung	31
2.7.	Elektroden	32
2.8.	Lösungen	33
2.8.1.	Spezifische Leitfähigkeiten	33
2.8.2.	pH-Werte	33
2.8.3.	Grundwasser	33
2.8.4.	Calzium-Gehalt	34
2.8.5.	Herstellung einer D 600-Lösung	34
2.9.	Auswertmethoden	35
2.9.1.	Mechanischer und elektrischer Reiz ..	35
2.9.2.	Nervenleitzeit und Transduktionszeit.	39
2.10.	Histologische Methodik	43

3.	Ergebnisse	45
3.1.	Vorversuche	45
3.1.1.	DC-Polarisation und Hautpotential	45
3.1.2.	Einzel- und Doppelfaserauswertung	51
3.1.3.	Ca^{2+} -Diffusion aus dem Fisch	58
3.2.	Histologie	61
3.3.	Hautpotential unter dem Einfluß verschiedener Ionen und seine Wirkung auf die Empfindlichkeit der Organe	64
3.4.	Die Antwort der Organe auf mechanische und elektrische Stimulation	68
3.4.1.	Empfindlichkeit der Rezeptoren	68
3.4.2.	Ermüdung nach Dauerreizung	73
3.4.3.	Starke elektrische Reizung	75
3.4.4.	Die Poststimulationspause	76
3.5.	Nervenleitzeit und Transduktionszeit ..	78
3.6.	Die Wirkung verschiedener Ionen auf die Mechano- und Elektrosensitivität ..	87
3.6.1.	K^{+} und Na^{+}	87
3.6.2.	Ca^{2+}	90
3.6.3.	Ca^{2+} -Antagonisten	98
3.6.3.1.	La^{3+}	98
3.6.3.2.	Co^{2+}	103
3.6.3.3.	Mg^{2+}	107
3.6.3.4.	D 600 und A-QA 39 Cl	112
3.6.3.5.	Streptomycin	121
4.	Diskussion.....	128
5.	Zusammenfassung.....	137
6.	Literaturverzeichnis	141

1. Einleitung

Mechanische Sinnesorgane, das heißt Sinnesorgane, welche auf mechanische Deformation reagieren, sind im Tierreich weit verbreitet.

Da solche Deformationen sehr unterschiedliche Ursachen haben können, ist auch die Vielfältigkeit der morphologischen Organisation dieser Rezeptoren sehr groß.

Einige dieser reizübertragenden Systeme jedoch zeigen starke Verwandtschaft.

So ist der Bogengang des Labyrinths phylogenetisch vom Seitenliniensystem der Fische abzuleiten (Bergeik 1967).

Diese Seitenliniensysteme besitzen Haarzellen als Überträger von Vibrationen, Druck oder auch - in seltenen, spezialisierten Fällen - von elektrischen Reizen (Flock 1971).

Histologische, elektrophysiologische und elektronenmikroskopische Studien (Hama 1978 a) konnten Übereinstimmungen in Morphologie und Funktionsweise dieser Haarzellen im Innenohr und im Seitenliniensystem nachweisen (Harris et al. 1969, Harris et al. 1967, Flock 1971).

Beide Systeme werden daher als Acustico-lateralis-System zusammengefaßt.

In der Seitenlinie von Fischen und Amphibien treten die Haarzellen, neben den spezialisierten Elektrorezeptoren, in zwei Gruppen auf:

- im Kanalorgan, dessen Rezeptoren unter die Haut in einen Kanal versenkt sind, und
- in freien Neuromasten, deren Zilien mit ihrer Cupula von der Hautoberfläche in das Außenmedium ragen.

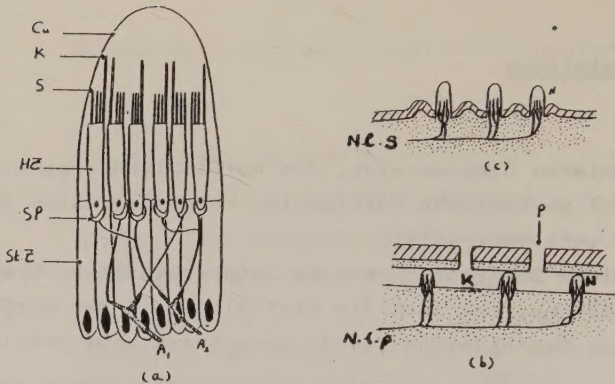


Abb. 1.a. Neuromast, besteht aus mehreren Sinneszellen

Cu = Cupula
K = Kinozilium
S = Stereozilien
HZ = Haarzelle
Sp = Synapse
St.Z. = Stützzelle

A₁, A₂ = beide, den Neuromasten innervierende Fasern

1.b. 3 Kanalorgane

P = Porus, K = Kanal, N = Neuromast
N.L.P. Nervus lateralis posterior

1.c. 3 freie Neuromasten

N = Neuromast,
N.L.S. Nervus lateralis superior¹

Da elektrophysiologische Untersuchungen am Seitenliniensystem relativ leicht durchgeführt werden können, dient dieses Studienobjekt auch als Modell für das akustische System des Innenohrs.

(1) Der Name wurde frei gewählt, in Anlehnung an Nervus lateralis posterior und anterior, da dieser Nerv in der Literatur nicht beschrieben ist. Bei anderen Arten werden die einzelnen freien Neuromasten von Seitenzweigen des Nervus lateralis posterior versorgt. (Harder 1965)

Die ersten elektrophysiologischen Messungen jedoch, deren Ergebnisse es erlaubten, ein Modell zur Funktionsweise der Haarzellen zu entwickeln, wurden am Cortischen Organ durchgeführt.

Dieses Modell, die sogenannte Batteriehypothese (Davis 1965), kann durch folgende Kausalkette beschrieben werden:

Über dem gesamten Sinnesepithel liegt ein bestimmtes Potential.

Durch dieses transepitheliale Potential (TEP) wird ein konstanter Stromfluß durch die Sinneszellen erzeugt, welcher die basale Sinneszellmembran depolarisiert und somit Transmitterausschüttung bewirkt (Furukawa et al. 1967, Flock et al. 1974).

Diese Transmitterausschüttung führt zu einer spontanen Aktivität der afferenten Nervenfaser. Die spontane Impulsfrequenz kann allein über eine Veränderung des Widerstandes der apikalen Sinneszellmembran, d.h. einer Permeabilitätsänderung dieser Membran, erhöht oder erniedrigt werden.

Wenn also ein adäquater Reiz auf die Sinneszelle trifft, dann bewirkt er eine Scherung der Zilien der Haarzelle, welche die beschriebene Widerstandsänderung hervorruft, wobei die Scherung in eine Richtung die Permeabilität der apikalen Sinneszellmembran erhöht (Widerstandserniedrigung), und somit über ein Rezeptorpotential zu vermehrter Transmitterausschüttung führt. Dieser folgt eine vermehrte Spike-Aktivität in der afferenten Nervenfaser.

Die Scherung der Zilien in die entgegengesetzte Richtung jedoch bewirkt eine Permeabilitätserniedrigung der Membran (Widerstandserhöhung) und führt somit zur Abnahme der Impulsfrequenz (Görner 1963, Flock et al. 1962).

Der in umseitig beschriebener Hypothese postulierte mechano-elektrische Transduktionsprozeß konnte in den folgenden Jahren durch verfeinerte elektrophysiologische Meßmethoden erhärtet werden.

So gelang es Harris et al. (1970) durch intrazelluläre Ableitungen mit KCl-Mikropipetten in den Haarzellen des Seitenlinienorgans von *Necturus* Rezeptorpotentiale zu messen, welche sich synchron zur mechanischen Reizung veränderten.

Derartige Korrelationen zwischen dem eingegebenen mechanischen Reiz und dem damit erzeugten Rezeptorpotential wurden an verschiedenen Objekten, nämlich am Seitenlinienorgan von *Xenopus* (Kroese et al. 1980), von *Lota lota* (Flock 1973) und an den Rezeptorzellen des Innenohrs vom Alligator (Weiss et al. 1974), sowie des Meerschweinchens (Russel et al. 1978) experimentell bestätigt.

Der Veränderung des Rezeptorpotentials muß jedoch nach der beschriebenen Hypothese eine Veränderung des apikalen Membranwiderstandes vorausgehen.

Hudspeth et al. (1977) gelang es in den Saccula-Haarzellen des Ochsenfrosches eine zum Reiz und Rezeptorpotential synchrone Veränderung des Membranwiderstandes zu messen, welche sich durch spätere Experimente auf die Stereozilien lokalisieren ließ (Hudspeth et al. 1979, Hudspeth 1981).

Obengenannte Ergebnisse führen automatisch zu der Frage nach dem Stromträger des Einwärtsstromes in die Sinneszelle.

Die hohe K^+ -Konzentration in der Endolymphe (Murrey et al. 1961) legt den Schluß nahe, daß K^+ -Ionen die Stromträgerfunktion durch die apikale Membran der Sinneszel-

len im Innenohr übernehmen (Sellik et al. 1975).

Welches Ion übernimmt aber diese Aufgabe in den Kanalorganen des Seitenliniensystems und in den freien Neuromasten, die in direktem Kontakt mit dem verhältnismäßig K^+ -armen Außenmedium Wasser stehen?

Die Aufrechterhaltung eines gleichbleibenden Milieus mit hoher K^+ -Konzentration über der apikalen Membran wäre hier allein durch eine konstante ionale Zusammensetzung der durch die Stützzellen produzierten Cupulae möglich.

In einigen Fällen wurde auch ein hoher Na^+ -Gehalt (Flock 1967) oder ein hoher K^+ -Gehalt (Russel et al. 1975) in Cupulastrukturen beschrieben.

In anderen Fällen jedoch sind überhaupt keine Cupulae vorhanden, wie beim "pit-organ" (freie Neuromasten) des Meeres-Aals *Conger myriaster*, während andere Spezies dieser Gattung Cupulae besitzen (Hama 1965).

Über die Permeabilität dieser Strukturen ist jedoch wenig bekannt.

Allerdings wurde eine starke Abhängigkeit der Sensibilität von Seitenlinienorganen gegenüber dem Salzgehalt im Außenmedium festgestellt (Katsuki et al. 1969, 1970, 1971).

Erst Corey et al. (1979) konnten durch voltage-clamp-Experimente Rezeptorströme in den sacculären Haarzellen des Ochsenfrosches messen, die sie als K^+ -Ströme identifizierten.

Diese K^+ -Ströme mußten jedoch über unspezifische Kanäle erfolgen, da K^+ durch andere Ionen (Na^+ , Ca^{2+}) teilweise ersetzbar war (Hudspeth et al. 1977).

Gleichzeitig konnten oben genannte Autoren zeigen, daß eine starke Reduktion von Ca^{2+} die Rezeptorpotentiale

unterdrückt; trotzdem kommt es als Stromträger nicht in Betracht, da seine Konzentration in der Endolymphe zu gering ist.

Somit scheint es eine wichtige Rolle als Cofaktor zu spielen. Diese Hypothese der Rolle des Ca^{2+} als Cofaktor wird durch Untersuchungen über die hemmende Wirkung von Antibiotika auf die Mechanorezeption bestätigt. Streptomycin, Neomycin oder Kanamycin blockieren die Mechanosensibilität der Haarzellen (Duvall et al. 1963, Matsuura et al. 1980, Wersäll et al. 1964), wobei ihre Wirkung kompetitiv durch Ca^{2+} reduziert werden kann (Shiozawa et al. 1979, Kroese et al. 1980).

Die Wirkung des Neomycin scheint darin zu bestehen, spezifische Ca^{2+} -Bindungsstellen auf biologischen Membranen zu besetzen und somit seine Bindung an die Membran zu verhindern (Schacht 1976, Hayashi et al. 1980).

Im Gegensatz zu der durch die Antibiotika-Versuche bestätigte Cofaktorrolle fand Sand (1975) eine direkte Abhängigkeit der mechanischen Empfindlichkeit von der Ca^{2+} -Konzentration des Außenmediums im Seitenliniensystem von Necturus.

Dabei führte eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration über der apikalen Sinneszellmembran zu vermehrter Mechano-sensitivität, während die Zugabe von EDTA die Empfindlichkeit blockierte.

Dieser Empfindlichkeitsverlust konnte durch eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration teilweise ausgeglichen werden.

Aufgrund dieser durch EDTA, d.h. durch Ca^{2+} - Verlust, hervorgerufenen Hemmung und der kompetitiven Hemmung der Rezeptorfunktion durch Ionen, die als Ca^{2+} - Antagonisten bekannt waren (Baker 1972), postulierte Sand eine Stromträgerfunktion des Ca^{2+} .

Ca^{2+} ist als Cofaktor in vielen neuronalen Systemen bekannt:

-So beeinflusst es die Entstehung von K^{+} - und Na^{+} -Spikes

durch Veränderung der Membranpermeabilität in Nervenfasern (Frankenhaeuser 1957),

-ist beteiligt an der Transmitterausschüttung von Synapsen,

-beeinflusst den Reiz-Kontraktionsvorgang im Herzmuskel (Baker 1972).

Spezifische Ca^{2+} -Kanäle werden in Herzmuskelzellen, Riesenaxonen (Baker 1972) und Synapsen beschrieben (Llinas 1982).

Die Messung solcher spezifischer Ionenströme erfolgt im allgemeinen durch ionenspezifische Elektroden oder über die Einstellung eines Gleichgewichtspotentials nach der "voltage-clamp"-Methode.

Zur Identifikation spezifischer Ionenkanäle dienen Ionen oder Substanzen, welche als Antagonisten zum gesuchten Ion bekannt sind, oder spezifische Kanalblocker.

Letztere Methode wurde in der vorliegenden Arbeit gewählt, um den Stromträger durch die apikale Sinneszellmembran im Seitenliniensystem klassifizieren zu können.

Weiterhin wurden neuere, detailliertere Erkenntnisse über die Aufgabe der apikalen Membran im Transduktionsprozeß, welcher nach der Batteriehypothese nur eine passive Rolle als regelnder Widerstand zukommt, angestrebt.

Der die freien Neuromasten des Aales (*Anguilla anguilla*) innervierende Nerv wurde in seinem Verlauf, seiner Nervenleitzeit und seiner Temperaturabhängigkeit beschrieben.



2. Material und Methoden

Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Experimente wurden am Seitenlinienorgan von ca. 40 - 60 cm langen Flußaalen (*Anguilla anguilla*) durchgeführt.

Die Tiere stammten aus der Fischzuchtanstalt SKW (Trostberg) und wurden anschließend in großen Tanks gehalten, welche mit Münchener Grundwasser gespeist wurden (15°C).

Während dieser Zeit (2 - 30 Tage) wurden sie mit einem Spezialfutter der obengenannten Fischzuchtanstalt gefüttert und erst nach wenigstens 2 Tagen Akklimatisationszeit verwendet.

Dabei mußten sie an die geringere Temperatur des Grundwassers (15°C, Zuchtbecken 25°C) angepaßt werden.

Die Experimente erfolgten bei Zimmertemperatur und wurden bis auf einige wenige Untersuchungen am Kanalorgan an den freien Neuromasten des Seitenliniensystems durchgeführt.

Dabei erwiesen sich die freien Neuromasten wegen ihrer Lage an der Hautoberfläche und ihrer somit freien Zugänglichkeit für Ionenlösungen als besonders günstig.

2.1. Präparation

Nachdem die Versuchstiere durch Injektion von 10 mg Gallamine triethiodide (Fa. Sigma, München) - einer chemischen Verbindung, welche in ihrer Wirkung Curare gleichzusetzen ist, d.h. die motorischen Endplatten blockiert - immobilisiert waren, wurden sie zur Präparation in einer länglichen Plastikwanne fixiert, deren Inhalt über einen Ablaufhahn in kurzer Zeit ausgetauscht werden konnte.

In dieser Plastikwanne konnte der gesamte Fischkörper, mit Ausnahme des Kopfes und der Kiemenregion, in der Lösung gehalten werden und somit ein Austrocknen der Organe verhindert werden.

In Höhe der Kiemenregion wurde dann der Nervus lateralis superior, welcher direkt unter der Haut verläuft, freigelegt.

Bei den wenigen Untersuchungen am Kanalorgan wurde der Nervus lateralis posterior nach derselben Methode präpariert. Dieser liegt in ca. 5 mm Tiefe direkt unter dem Kanal der Seitenlinie.

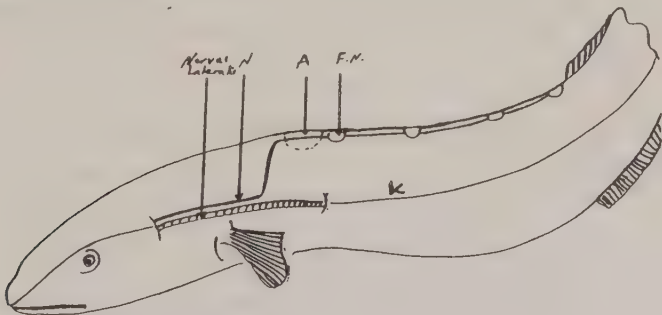


Abb. 2. Verlauf des Nervus lateralis posterior der Kanalorgane (K) und des Nervus lateralis superior der freien Neuromasten (N)

(A) = Ableitstelle, (F.N.) = freier Neuromast

Der die freien Neuromasten innervierende Nerv verläuft dorsal, parallel zum Seitenliniennerv, direkt unter den Organen, wobei jeder Ast 5 - 10 freie Neuromasten innerviert.

Jedem Neuromasten können 2 afferente Fasern zugeordnet werden (Hama 1978).

Kurz vor Eintritt ins Gehirn verbindet sich dieser Nerv mit dem Nervus lateralis posterior der Kanalorgane, wobei nicht untersucht wurde, ob er in diesen eintritt, oder nur parallel neben ihm herläuft.

Ebenso wurde die Einmündungsstelle ins Gehirn nicht lokalisiert.

Die Anzahl der vorhandenen Neuromasten ist von der Größe und dem physiologischen Zustand des Tieres abhängig. Sie werden z.B. bei schlechten Ernährungsbedingungen reduziert.

Die folgende Abbildung zeigt die Anordnung der Organe auf der Haut, wobei jedoch nur die zur Rückenflosse parallel liegenden Organe in dieser Arbeit verwendet wurden.

Innervation und Funktion der anderen Organe wurden nicht untersucht.

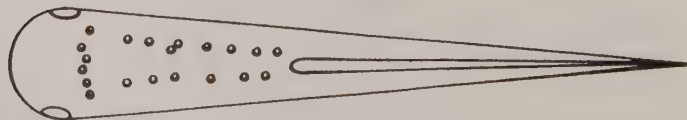


Abb. 3. Anordnung der freien Neuromasten in der Aalhaut.

Bei den Experimenten zur Bestimmung der Nervenleitzeit bei Zimmertemperatur und Kühlung wurde das Hautstück mit dem zu untersuchenden Organ aus der Rückenmuskulatur herausgetrennt.

Der Nerv wurde in Richtung Gehirn herauspräpariert und dann abgeschnitten.

Dieser Hautlappen mit dem freipräparierten Nerven wurde auf einer Kupferplatte fixiert, welche zur Kühlung des Präparates mit einem Peltièr-Element verbunden war (Versuchsanordnung s. Abb.6.).

Von dem vom Blutkreislauf isolierten Gewebe konnten Aktionspotentiale vom Nerv und direkt über dem Organ aus der Haut abgeleitet werden (s.a. Kap. 2.3. und Kap. 3.5.).

2.2. Versuchsanordnungen

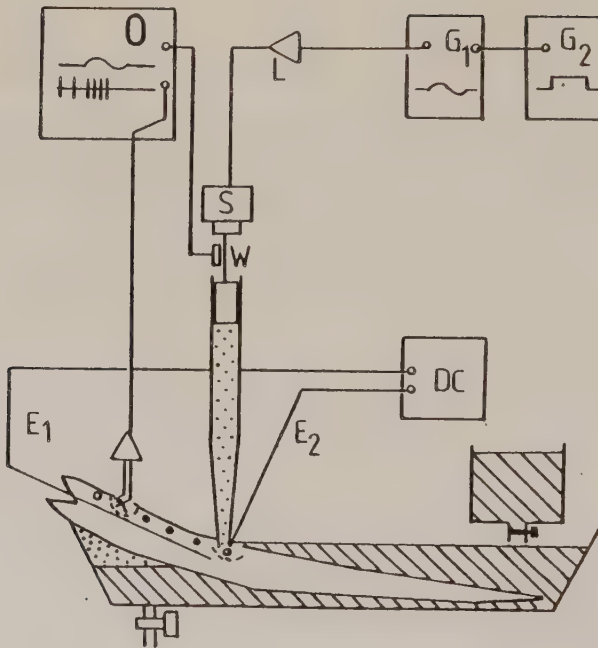


Abb. 4. Versuchsanordnung zur Messung der Impulsantwort auf einen Strömungsreiz und auf elektrische Reizung.

- G₁ : Sinusgenerator
- G₂ : Rechteckgenerator
- DC : Rechteckgenerator zur elektrischen Reizung
- E₁, E₂ : Reizelektroden
- L : Leistungsverstärker
- S : Schwingerreger
- W : Wegmesser
- O : Oszillograph

Abbildung 4 zeigt den Versuchsaufbau, so wie er für die Experimente an den freien Neuromasten verwendet wurde, mit Ausnahme der Versuche mit D 600 und A-QA 39 Cl.

Die Lösung in der Spritze und in der Präparierwanne hat die gleiche Ionenzusammensetzung.

Die Reizung erfolgt durch das Ausströmen kleiner Lösungsmengen aus der Spritze (Kap. 2.4.1.1.).

Die beiden KCl-Elektroden E_1 und E_2 dienen der elektrischen Reizung (Kap. 2.4.2.).

Da von den verwendeten Ca^{2+} -Kanalblockern (Kap. 3.6.3.4.) nur sehr geringe Mengen zur Verfügung standen, mußte der Versuchsaufbau bei diesen Experimenten geändert werden.

Deshalb wurden die Testlösungen dem Organ über ein Glasrohr appliziert. Das Organ befand sich außerhalb der Wannenlösung.

Mit einem Mikromanipulator konnte das Glasrohr vorsichtig vom Organ entfernt werden und die Testlösung ausgetauscht werden.

Die in Abbildung 4 beschriebene Reizform mußte somit auch verändert werden.

In diesen Fällen wurden die Organe mit Erschütterungsreizen stimuliert, welche mittels eines an einer Lautsprechermembrane befestigten Plastikstabes auf das Glasrohr übertragen wurden (Kap. 2.4.1.2., Ergebnisse: Abb. 51. bis Abb. 54.).

In einigen Experimenten mit Kanalorganen wurden diese Erschütterungsreize auch angewendet, indem hier der Plastikstab direkt über dem Rezeptor in der Wannenlösung fixiert wurde (Abb. 26a., Abb. 27 a., Abb. 27.b. und Abb. 42.).

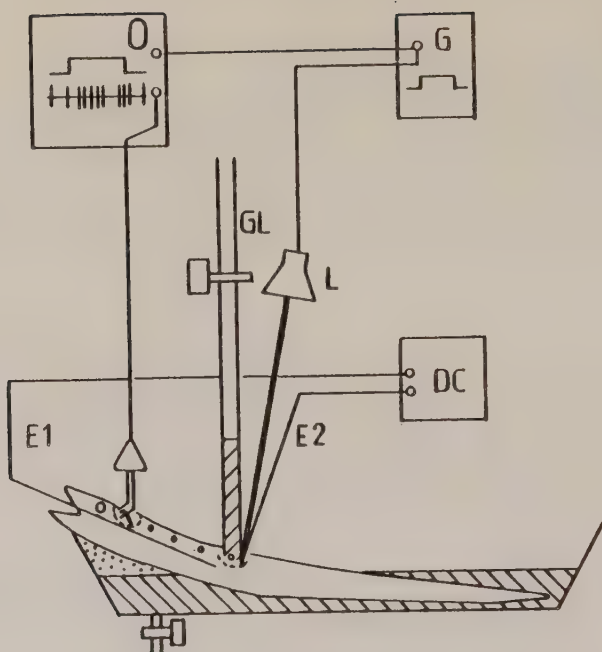


Abb. 5. Versuchsanordnung zur Messung der Impulsantwort auf einen Erschütterungsreiz und auf elektrische Reizung unter D 600 und A-QA 39 C1

G: Rechteckgenerator
 DC: Rechteckgenerator zur elektrischen Reizung
 E₁, E₂: Reizelektroden
 L: Lautsprecher
 GL: Glasrohr mit Testlösung über dem Organ
 O: Oszillograph

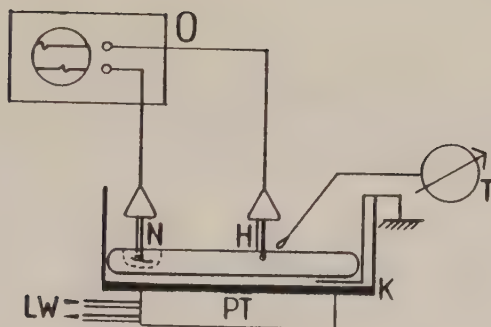


Abb. 6. Versuchsanordnung zur Bestimmung der Nervenleitzeit

bei Zimmertemperatur und
bei Kühlung

- N : Ableitung vom Nerv
- H : Ableitung von der Haut
- T : Thermometer
- K : Kupferplatte
- Pt : Peltièr-Element
- LW : Wasserkühlung
- O : Oszillograph

Für die in Kapitel 2.6. beschriebene Kühlungsmethode zur Bestimmung der Abhängigkeit der Nervenleitzeit von der Temperatur (Kap. 3.5.) wurde ein Hautstück mit dem zu untersuchenden Organ vom Fisch abgetrennt und mittels eines Peltièr-Elementes gekühlt.

Dabei handelt es sich um ein elektrisches Kühlaggregat.

Die Ergebnisse dieser Methode werden in den Abbildungen 33 und 34 aufgezeigt.

2.3. Ableitung

2.3.1. Ableitung von Aktionspotentialen am Nervus lateralis posterior und am Nervus lateralis superior.

Zur Messung der Nervenimpulse wurde die Ableitelektrode kurz über dem Nerv fixiert, während die indifferente Elektrode in das Muskelgewebe der Operationswunde gestochen wurde.

Die Ableitelektroden bestanden aus Silberdraht von ca. 2 cm Länge, mit leicht gebogener Spitze und 0,5 mm Durchmesser. Der Draht war elektrolytisch chloriert worden.

Bei der Impulsableitung vom Nervus lateralis posterior wurden mit Hilfe feiner Pinzetten möglichst kleine Faserbündel aus dem Nerv gezupft und auf die Ableitelektrode gelegt, sodaß die Impulse einer einzigen aktiven Faser aus diesem Bündel abgeleitet werden konnten. Durch Reizen mit einem Feinhaarpinsel wurde das von dieser Faser innervierte Organ entlang des Seitenlinienkanals geortet.

Nach der gleichen Reizmethode wurden Organe der freien Neuromasten, von welchen gute Aktionspotentiale abgeleitet werden konnten, gesucht, die übrigen Organe durch Cauterisation zerstört.

Diese Prozedur war notwendig, da sonst nur die Impulse des gesamten Nerts, anstatt von kleinen Faserbündeln, hätten abgeleitet werden können.

Der geringe Durchmesser dieses Nerts (er besteht nur aus 20-40 Fasern) erlaubt es im Gegensatz zum Nervus lateralis posterior (ca. 800 Fasern) nicht, präparativ

Teile des Nervs voneinander zu trennen, ohne stärkere Quetschungen oder Dehnungen zu verursachen.

Deshalb wurde der gesamte Nerv von seiner Unterlage gelöst und über die Ableitelektrode gehängt.

Nachdem alle Organe, außer einem, cauterisiert worden waren, konnten somit die Impulse dieses intakten Organs registriert werden.

Die verstärkten Impulse wurden dann vom Oszillographen abphotographiert und über einen Kopfhörer abgehört.

Diese Ableitmethodik ermöglicht es jedoch nur, die Aktionspotentiale beider den freien Neuromasten innervierenden afferenten Fasern zu registrieren.

Auch ist es mit der in Kapitel 2.4.1.1. beschriebenen mechanischen Reizform nur in den seltensten Fällen möglich, den Eintrittswinkel des Reizes zum Organ so optimal (senkrecht zur Medianebene des Fisches) zu treffen, daß nur die Rezeptorzellen einer Orientierungsrichtung antworten, während die anderen gehemmt werden (siehe Kap. 3.1.2., Abb.20.a., Abb.20.b.).

In den meisten Fällen besteht die Antwort aus einer Mischung der Impulse beider Fasern.

Diese gemischte Impulsantwort ist in erster Linie von dem bereits erwähnten Auftrittswinkel des Reizes abhängig (Hudspeth 1983), kann aber möglicherweise auch durch die Trägheit der Cupula verursacht werden, welche bei stärkeren Reizen in Schwingungen versetzt werden kann (burstartige Impulsantwort).

Selbst bei optimalem mechanischem Reiz ist es jedoch

bei zusätzlichem elektrischem Reiz nicht von vorneherein auszuschließen, daß dieser die Sinneszellen sensibilisiert oder die Reizschwelle herabsetzt, sodaß ursprünglich unterdrückte Spikes ausgelöst werden (siehe Kapitel 3.1.2., Abb.20.b.).

Diese Problematik könnte nur mit geänderten Ableitbedingungen, d.h. spitzenisolierten Elektroden mit kleinem Spitzendurchmesser zur Einzelfaserableitung im Nerv behoben werden.

In einigen Fällen (etwa jede 5. Präparation) waren die Ableitbedingungen jedoch so optimal, daß die Spikes beider Fasern anhand ihrer Amplitudenhöhe während des gesamten Experiments unterschieden werden konnten.

Da einige Experimente jedoch über Zeiträume von 1-2 Stunden durchgeführt werden mußten, konnte es passieren, daß sich die Ableitbedingungen im Laufe des Versuches stark verschlechterten (z.B. durch Austrocknung der Fasern), was oft eine starke Verkleinerung der Impulsamplituden zur Folge hatte und damit eine Faserunterscheidung nicht mehr zuließ.

Obwohl die in Kapitel 3 beschriebenen Ergebnisse der Inhibitor-Wirkungen auf die Sinneszellen nur qualitative Aussagen über die Mechano- und Elektrosensitivität der Rezeptoren erlauben, und somit unabhängig davon sind, ob die Antwort beider Fasern auf einen Reiz oder nur eine Faser ausgezählt wird, wurden trotzdem möglichst nur Einzelfaserergebnisse verwendet.

In einigen Experimenten jedoch ist ein eindeutiges Ergebnis von einer Einzelfaserauswertung abhängig. Deshalb wurden hier Kanalorgane (Abb.27.) verwendet (Einzelfaserpräparation), oder freie Neuromasten, wenn die Auswertung nur einer Faser eindeutig war (Bestimmung der Nervenleitzeit Kap.3.5., Abb.32.- Abb.37.).

2.3.2. Ableitung von Aktionspotentialen von der Haut

Um die Nervenleitzeit (und Temperaturabhängigkeit) des Nervus lat. superior zu bestimmen, wurden Aktionspotentiale von der Haut und gleichzeitig vom Nerv abgeleitet und registriert.

Der Hautableitung dienten die gleichen Ag/AgCl-Ableit-elektroden wie bei der Nervenableitung (Beschreibung siehe Kap. 2.3.1.).

Diejenige Elektrode, welche die Impulse von der Haut registrieren sollte, war direkt auf das Organ aufgesetzt, die indifferente tauchte in die Wannenzusatzlösung ein.

Zu diesem Zweck war die Lösung in der Präparierwanne soweit reduziert worden, daß das verwendete Organ sich außerhalb der Lösung befand.

Durch Triggern des Oszillographen mit den Impulsen der Hautableitung konnte die Zeitverschiebung zwischen Hautableitung und Ableitung vom Nerv registriert werden.

Durch zusätzliche Messung des Abstandes Organ:Ableitstelle am Nerv konnte dann die Nervenleitzeit (Nervenleitgeschwindigkeit) bestimmt werden.

2.4. Reizung

2.4.1. Mechanische Reizung

Die beiden afferenten Fasern eines Organs antworten auf entgegengesetzte Reizrichtungen mit einer Erhöhung der Impulsfrequenz.

Die optimale Reizrichtung (maximale Frequenzerhöhung) liegt dabei bei den freien Neuromasten senkrecht zur Medianebene des Fisches, bei den Kanalorganen parallel zur Längsachse (Hama 1978).

Die Organe wurden alle 2 sec mechanisch gereizt, der Reiz und die Antwort der afferenten Faser auf dem Oszillographen aufgezeichnet und photographiert. Die Länge der Erholungspause (2 sec) zwischen den Reizen war so gewählt worden, daß sich das Organ in keiner "Ermüdung" befand, d.h. aufeinanderfolgende Reize gleicher Intensität lösten Reizantworten gleicher Stärke aus (s.a. Kap. 3.4.2, 3.4.3 und 3.4.4).

2.4.1.1. Strömungsreize

In der Mehrzahl der Experimente (Ausnahmen: Kanalorgane, D 600, A-QA C1 39-Versuche) wurden die Rezeptoren mit langsamen Wasserströmungen stimuliert.

Hierzu diente eine Spritze, deren Stempel fest mit der Membrane eines Schwingungserregers verbunden war. Dieser Schwingungserreger wurde über einen Leistungsverstärker von einem Sinusgenerator gespeist, diesem wiederum ein Reizfenster durch einen Rechteckgenerator vorgegeben.

Als Reizgröße wurde die Bewegung des Spritzenstempels von einem Wegmesser registriert, dann über einen Impulswandler vom Oszillographen als relative Maßeinheit in Volt aufgezeichnet (siehe Abb.4.).

Folgende Oszillographenbilder zeigen die beiden verwendeten Formen des Strömungsreizes:

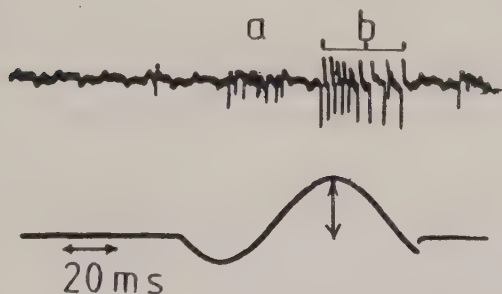


Abb. 7.a. Sinusreiz

Der senkrechte Pfeil gibt die relative Reizstärke in mV an, zu welcher die Antwort b gehört (9 Spikes)

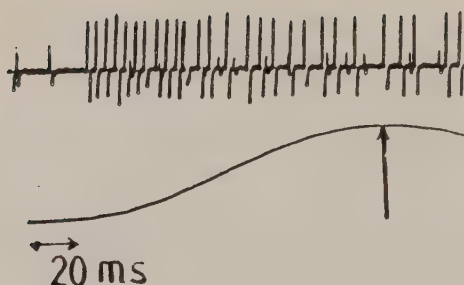


Abb. 7.b. Langsam ansteigender Strömungsreiz
Senkrechter Pfeil: mech. Reizstärke in mV

Ein Gummischlauch verband den Spritzenausgang mit einem Plastikrohr von 3 mm Durchmesser, dessen Öffnung etwa 1 mm über dem Organ fixiert war.

Durch die Beweglichkeit dieses Systems konnte mittels eines Mikromanipulators ein optimaler Strömungswinkel zum Organ eingestellt werden.

Ein optimaler Reiz zeichnet sich durch höchste Empfindlichkeit, Stabilität in der Impulsfrequenz und gleichbleibende Antwort über die gesamte Reizdauer aus.

Damit gewährleistet war, daß sich die Ionenzusammensetzung über dem Rezeptor während des Experiments nicht änderte, mußte bei jedem Lösungswechsel in der Präparierwanne auch der Spritzeninhalt gewechselt werden.

2.4.1.2. Erschütterungsreize

Die gegenüber den freien Neuromasten weniger empfindlichen Kanalorgane wurden mit Erschütterungsreizen stimuliert (Abb.26., Abb.27.a, Abb.27.b., Abb.42.).

Dabei wurde ein Plastikstab, welcher an der Membrane eines Lautsprechers befestigt war, ca. 1 mm über dem Rezeptor fixiert.

Die Lautsprechermembrane konnte durch einen Rechteckgenerator in Schwingungen versetzt werden, welche dann über den Plastikstab auf den Rezeptor übertragen wurden (Abb.5.).

Als relative Meßeinheit diente die angelegte Generatorspannung, nachdem die Linearität der Lautsprecherreaktion mittels eines Unterwassermikrophons geprüft worden war (Abb. 7d.).

Bei den Experimenten mit D 600 und A-QA 39 C1 (Abb.51 - Abb.54.) wurde das gleiche Reizsystem verwendet, nur wurde hier der Erschütterungsreiz durch den Plastikstab auf ein Glasrohr mit Testlösung übertragen, welches auf das Organ aufgesetzt war (Abb.5., Kap. 2.2.).

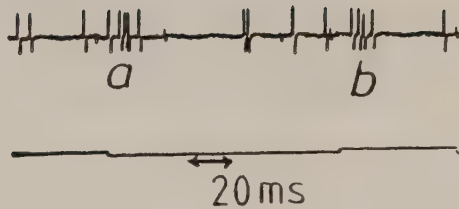


Abb. 7 c. Erschütterungsreiz

Im unteren Strahl ist die relative Reizstärke in mV (Höhe der an den Lautsprecher angelegten Spannung) aufgezeichnet.

a = Antwort auf die Bewegung des Plastikstabes zum Organ hin

b = Antwort auf die Bewegung des Plastikstabes vom Organ weg

Da das Leistungsspektrum der Lautsprechermembrane nicht bekannt war, mußte die Linearität des Reizes (Membranausschlag) im Rahmen der eingegebenen Rechteckimpulse untersucht werden.

Diese Messung war bei den übrigen Experimenten nicht nötig, da hier die mechanische Reizgebung anhand eines Wegmessers aufgezeichnet wurde.

Abbildung 7d zeigt eine Messung mit einem Hydrophon, wobei für jeden eingegebenen Impuls die Druckwelle im Wasser, hervorgerufen durch den Plastikstab, registriert wurde.

Die Reaktion des Lautsprechers wird verglichen mit der des Schwingerreger.

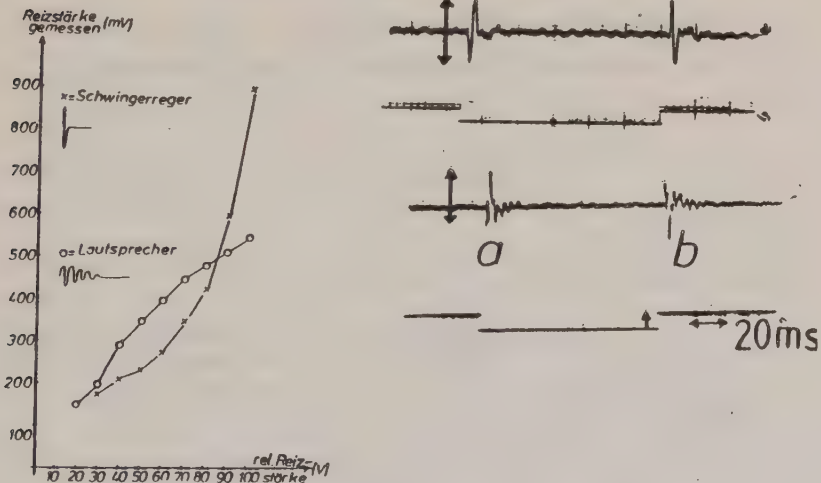


Abb. 7d.: Linearität des Lautsprecherreizes:
Messung der Reizstärke mittels eines Hydrophons. Im Vergleich:
Schwingerreger:Lautsprecher

Rechts oben:Originalaufzeichnung Schwingerreger

Rechts unten:Originalaufzeichnung Lautsprecher

Unterer Strahl: Höhe des Rechtecks = rel. Reizstärke

Oberer Strahl: senkrechte Pfeile geben die gemessene Reizstärke an.

Die vorangegangenen Beschreibungen zeigen, daß die angegebenen mechanischen Reizstärken in relativen Einheiten (rel. E.) von Strömungsreizen und Erschütterungsreizen nicht direkt miteinander verglichen werden können.

Im Falle der Strömungsreize stellen die rel.E. der mechanischen Reizstärken die durch den Wegmesser gemessene Bewegung des Spritzenstempels dar, sind also ein direktes Maß für die Reizstärke.

Bei den Erschütterungsreizen jedoch, werden die mechanischen Reizstärken als Maß für die an den Lautsprecher angelegte Spannung angegeben. Die Linearität der Lautsprecherreaktion jedoch läßt gewisse Vergleichsmöglichkeiten der beiden Reizformen zu (Abb.7d).

Die folgenden Originalaufzeichnungen sollen die verschiedenen angewendeten Reizformen und die Art ihrer Antwort im Vergleich zeigen.

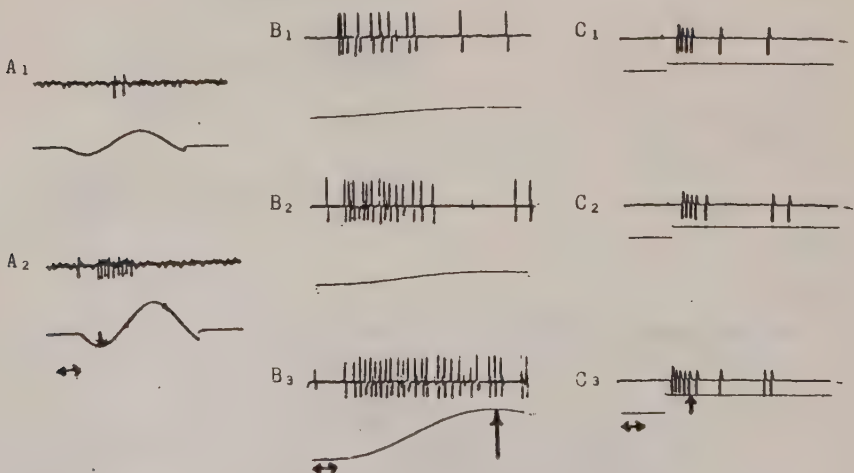


Abb.8: Drei mechanische Reizformen im Vergleich:
A: Sinusreiz, A_1 : 1 rel. E., A_2 : 2 rel. E.
B: langsam anst. Strömungsreiz
 B_1 : 1 rel. E., B_2 : 1.5 rel. E., B_3 : 6.5 rel. E.
C: Erschütterungsreiz, C_1 : 1.5 rel. E., C_2 : 2.5 rel. E.,
 C_3 : 4.5 rel. E. (senkrechte Pfeile)
waagr. Pfeile: A=20ms, B=20ms, C=10ms

2.4.2. Elektrische Stimulation; Polarisation der Fischhaut

Als Reizelektroden dienten Glasröhrchen mit 0,2 mm Durchmesser, die mit 3 M KCl gefüllt waren und elektrolytisch chlorierte Silberdrähte enthielten.

Ihr Widerstand betrug 15 - 19 k Ω (siehe auch Kap.2.7.).

Eine der beiden Reizelektroden (E_1) wurde durch das Fischmaul in den Darm eingeführt, während die andere Elektrode (E_2) ca. 2mm senkrecht in der Lösung über dem zu reizenden Organ fixiert war (s. Abb.4, Abb.5.).

E_1 und E_2 wurden über einen Stabilisationswiderstand (55 k Ω , vor E_1) von einem Rechteckgenerator gespeist.

Die Stromflußrichtung konnte frei gewählt, d.h. die Polarität der Elektroden vertauscht werden.

Der elektrische Reiz wurde in zwei verschiedenen Formen angewendet:

- a) als langanhaltende Polarisierung der gesamten Fischhaut zusätzlich zur mechanischen Reizung (s.a. Hautpotentialmessung Kap. 3.1.1.).

Dabei wurde der Rezeptor durch Gleichstrom beider Polarisationsrichtungen vorpolarisiert, indem der Strom ca. 1 sec vor Beginn des mechanischen Reizes eingeschaltet wurde und über die gesamte Reizdauer des mechanischen Reizes beibehalten wurde (Elektrische Reizdauer ca. 3 Sekunden).

- b) als kurzer Rechteckreiz (ca. 90 ms), zur Veränderung der Spontanaktivität.

Auch in diesem Fall wurde der Rezeptor in beiden Polarisationsrichtungen stimuliert (Ergebnisse siehe Kap. 3.4.).

2.5. Hautpotentialmessung

Da nicht von vornherein ausgeschlossen werden konnte, daß die Wirkungen der verwendeten Ionen allein auf einer Veränderung des Hautpotentials beruhen, wurde dieses unter dem Einfluß der später verwendeten Testlösungen gemessen (s. Kap.3.3., Abb.24., Abb.25.).

Dazu wurde der Fisch in einem länglichen Plastikbehälter senkrecht aufgehängt, sodaß sich das Maul außerhalb der Lösung befand.

Die Lösung in dem Behälter konnte durch einen Abflußhahn an seiner Basis abgelassen und somit ausgetauscht werden.

Die verwendeten MeBelektroden entsprachen den im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Reizelektroden ($\emptyset$ 2mm, 3 M KCl-Agar, Ag/AgCl, R = 15-19 k Ω).

Sie wurden nach der in Kapitel 2.7. beschriebenen Methode ausgewählt.

Eine MeBelektrode war durch das Maul des Fisches in den Darm eingeführt, die andere durch ein abgedichtetes Loch in der Plastikwand geschoben, sodaß ihre Öffnung in der Lösung über der Fischhaut fixiert war.

Die nach Lösungswechsel auftretenden Potentialänderungen wurden mit einem Schreiber aufgezeichnet.

Durch mehrfaches Spülen mit Leitungswasser konnte das Hautpotential nach jeder Messung auf seinen normalen Wert zurückgeführt werden.

2.6. Kühlung

Zur Messung der Nervenleitzeit bei verschiedenen Temperaturen wurde das vom Fisch abpräparierte Hautstück mit Nerv und Organ (s.a. Kap.2.1. Präparation) über eine Kupferplatte mit einem Peltiër-Element gekühlt und Impulse von der Haut, sowie vom Nerv abgeleitet (s. Kap. 2.3. Ableitung, Kap.2.2., Abb.6).

Die Messung der Temperatur erfolgte mittels einer Mikrosonde auf der Haut (am Organ) und unter der Haut (in Höhe des Nerven), um so unterschiedliche Kühltemperaturen von Organ und Nerv zu verhindern.

Das Hautstück konnte innerhalb von 5 Minuten von Zimmertemperatur (24°C) bis auf ca. 8°C abgekühlt werden. Die Temperatur auf der Haut gegenüber der unter der Haut unterschied sich im Höchstfall um $0,5^{\circ}\text{C}$.

Zur Berechnung der Nervenleitzeit wurden die unter der Haut erfolgten Temperaturmessungen verwendet.

2.7. Elektroden

Zur elektrischen Reizung der Organe (Kap.2.4.2.) und zur Messung der Hautpotentialänderungen unter Einfluß verschiedener Ionen (Kap.2.5.), sowie des Potentials über der Haut bei elektrischer Reizung (Kap.3.1.) wurden nur Elektroden verwendet, die

- a) keine größere Potentialdifferenz aufwiesen als 0 - 2 mV,
- b) in verschiedenen Lösungen keine Potentialänderungen aufwiesen.

Potentialänderungen durch Eintauchen der Elektroden in verschiedene Lösungen konnten durch Vergleichsmessungen mit Standardelektroden registriert werden.

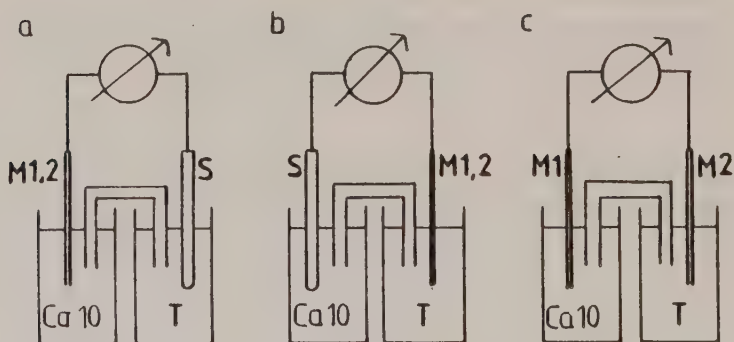


Abb. 9. Anordnung zur Messung der Potentialdifferenz und Stabilität der beiden Meßelektroden M_1 und M_2 mit Hilfe einer Standardelektrode S (Pusl, Ingold)

Brücke : Glasrohr mit 1 M KCl-Agar
 M_1 , M_2 : Glasmakropipetten mit 3 M KCl-Agar und Ag/AgCl-Draht
Standardlösung: CaCl_2 10 mM
T = Testlösung

Die Potentialänderungen der Elektroden wurden in den Testlösungen gemessen, welche in späteren Ionenexperimenten benutzt werden sollten (Kap. 3.6.).

2.8. Lösungen

2.8.1. spezifische Leitfähigkeiten $|\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}|$

Ca^{2+} 0,2 mM : $5,28 \times 10^{-5}$	
Ca^{2+} 2 mM : $3,3 \times 10^{-4}$	Na^{+} 2 mM : $2,8 \times 10^{-4}$
Ca^{2+} 10 mM : $1,54 \times 10^{-3}$	Na^{+} 50 mM : $3,3 \times 10^{-3}$
Ca^{2+} 50 mM : $5,72 \times 10^{-3}$	Na^{+} 100 mM : $6,6 \times 10^{-3}$
Ca^{2+} 100 mM : $1,056 \times 10^{-2}$	

Ca^{2+} 2 mM + Co^{2+} 10 mM : $1,8 \times 10^{-3}$
Ca^{2+} 2 mM + Co^{2+} 30 mM : $4,0 \times 10^{-3}$
Ca^{2+} 2 mM + Na^{+} 100 mM : $6,93 \times 10^{-3}$
Ca^{2+} 2 mM + Mg^{2+} 40 mM : $6,0 \times 10^{-3}$

2.8.2. pH-Werte von D 600 und A-QA 39 Cl

D 600 5 mM = 6,61

A-QA 39 Cl 200 μM = 7,4

2.8.3. Grundwasser (Analyse des Grundw. d. zoolog. Inst. Nov. 1983, durchgeführt von: Dr. P. Udluft, Inst. f. Wasserchemie und Balneologie, TU München).

Kationen:	Na^{+} 48,2 mg/l	Anionen:	Cl^{-} 152,7 mg/l
	K^{+} 7,0 mg/l		NO_3^{-} 49,6 mg/l
	Ca^{2+} 90,1 mg/l		SO_4^{2-} ... 63,5 mg/l
	Mg^{2+} 24,6 mg/l		HCO_3^{-} .. 283,4 mg/l

2.8.4. Ca^{2+} - Gehalt

verwendetes Aqua dest. für die Ionenlösungen:

neu destilliert : 0,0 mg Ca^{2+}

alt : 15,1884 $\mu\text{g}/\text{l} \hat{=} 0,3798 \mu\text{M} \text{Ca}^{2+}$

Titrationismethode

5 ml Titrierlösung mit H_2O auf 25 ml auffüllen

+ 2,0 ml HCl (1mM) + 1 ml MgCl_2 (0,01 mM)

+ 8,0 ml NaOH (1mM) + Aqua dest. auf 50 ml auffüllen

+ 50 mg angereichertes Murexid

(1g Murexid + 100 g NaCl staubfein verrieben).

Maßlösung : 0,01 mM $\text{Na}_2(\text{H}_2\text{Y})$ -Titriplex

2.8.5. Herstellung einer D 600 - Lösung

(Experimente Kapitel 3.6.3.4.)

Da sich D 600 schwer in Wasser, aber gut in Alkohol lösen läßt, mußte eine konzentrierte Alkohol - D 600 - Lösung hergestellt werden, welche dann mit einer 2 mM CaCl_2 -Lösung bis zur gewünschten D 600-Konzentration verdünnt wurde:

Basislösung : 200 mg D 600 in 2 ml 90% Äthanol

Verdünnung : Basislösung + 2 mM CaCl_2 -Lösung 1:1000

D 600 : Molekulargewicht 521,10 g

100 mg/ml $\hat{=} 0,19 \text{ M}$

1 : 1000 verdünnt $\hat{=} 190 \mu\text{M}$

Äthanol absolut : Molekulargewicht 46,07 g

1l wiegt 790g

$$+ \frac{790}{46,07} \hat{=} 17,15 \text{ Mol}$$

$$\text{Äthanol 90\% : 1l} \hat{=} \frac{17,15 \times 9}{10} = 15,43 \text{ Mol}$$

Verdünnung 1:1000 $\hat{=} 15,43 \text{ mM}$ 90% Äthanol

2.9. Auswertmethoden

2.9.1. Mechanischer und elektrischer Reiz

In allen verwendeten Reizformen, den mechanischen Strömungsreizen, den Erschütterungsreizen, sowie den elektrischen Rechteckreizen (s. Kap.2.4.1. und Kap.2.4.2.) wurde die Anzahl der Impulse, welche auf einen Reiz folgt, als Maß für die Reaktion des Rezeptors ausgezählt. Dazu wurde ein bestimmtes Zeitfenster innerhalb der Antwort ausgewählt, welches für die Auswertung der ganzen Versuchsreihe beibehalten wurde.

In den meisten Fällen konnte die Impulsantwort einer afferenten Faser ausgewertet werden, in manchen Fällen jedoch, wenn die Spikes beider Fasern die gleiche Amplitude hatten, und somit nicht voneinander zu trennen waren, wurden die Antworten beider Fasern zusammengezählt (s.a. Kap.3.1.2.).

Diese Problematik war bereits in Kapitel 2.3.1. beschrieben worden.

Um die Auswertmethodik in jeder Versuchsreihe zu veranschaulichen, ist jeder Abbildung ein Inset mit einem typischen Reiz-Antwort-Bild beigelegt (s. Ergebnisse Kap.3.).

In diesem Inset ist jedesmal das ausgewertete Zeitfenster durch einen Pfeil markiert.

Die folgenden Originalaufzeichnungen demonstrieren die beschriebene Methode:

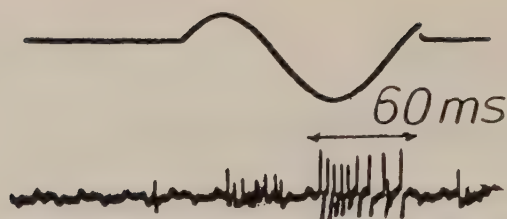


Abb.10 a. Originalaufzeichnung eines typischen Reiz-Antwort-Bildes:
mechanischer Sinusreiz,
die Antwort einer afferenten Faser wurde in
einem Zeitfenster von 60 ms ausgezählt
(9 Impulse)

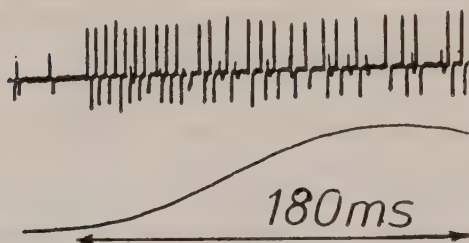


Abb.10 b. Originalaufzeichnung eines typischen Reiz-Antwort-Bildes:
mechanischer Strömungsreiz,
die Antwort einer afferenten Faser wurde in
einem Zeitfenster von 180 ms ausgezählt.
(26 Impulse)

In beiden oben gezeigten Beispielen handelt es sich um Einzelfaserauswertungen. Bei Sinusreizen (Abb.10a) wurde das Zeitfenster so gewählt, daß innerhalb dieses Fensters die gesamte Antwort einer Faser während der ganzen Versuchsreihe ausgezählt werden konnte. Bei Doppelfaserauswertung wurde das Fenster so erweitert, daß beide Fasern ausgezählt werden konnten.

Bei Strömungsreizen (Abb.10b) wurden immer die folgenden 180 ms nach Reizbeginn ausgezählt, der Reizbeginn wurde nach einmaliger Eichung des Reizgerätes für alle Versuche beibehalten und zwischendurch immer wieder durch den Artefakt in der registrierten Nervenableitung überprüft.

Bei elektrischen Reizen wurde die gesamte Spikeantwort von Reizbeginn bis Reizende ausgezählt.

Bei Erschütterungsreizen richtet sich das Zeitfenster nach der Länge der Reizantwort. Diese ist durch die kurzen Intervalle zwischen den Spikes gut von der folgenden Spontanaktivität zu trennen.

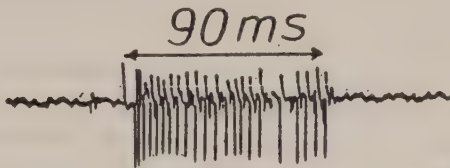


Abb.10 c. Originalaufzeichnung eines typischen Reiz-Antwort-Bildes:
elektrischer Reiz,
Erhöhung der Spontanaktivität durch einen Reiz von 90 ms Dauer.
Die Antwort einer afferenten Faser wurde ausgezählt.
(21 Impulse).

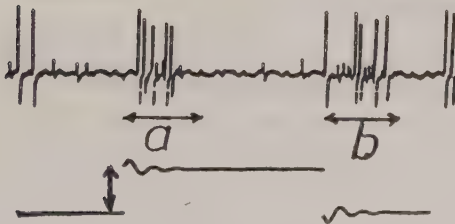


Abb.10 d. Originalaufzeichnung eines typischen Reiz-Antwort-Bildes:
mechanischer Erschütterungsreiz,
beide Antworten einer Faser (a+b) von jeweils 45 ms wurden zusammengezählt
(10 Impulse)
unterer Strahl= rel.Reizstärke in mV (senkrechter Pfeil)

Diese Reizform des mechanischen Erschütterungsreizes wurde bei den Experimenten an den Kanalorganen (Abb.26.a., Abb.27., Abb.42.) und an den freien Neuromasten unter D 600 und A-QA 39 Cl angewendet (Kapitel 3.6.3.4., siehe auch Abb.7 c., Kap. 2.4.1.2. Methodik).

In den Abbildungen der Ergebnisse (Kap. 3.6.) wurde jeweils ein Experiment dargestellt.

Mittelwertsdarstellungen mehrerer Versuche waren nicht möglich, da für jedes Experiment das Zeitfenster für die Auszählung der Impulse neu bestimmt werden mußte.

In anderen Fällen wurde auch der Reiz verändert, oder eine Versuchsreihe an mehreren Organen durchgeführt.

Da die Rezeptoren sich in ihrer Sensitivität (d.h. Anzahl der Impulse auf einen Reiz) sehr stark unterscheiden, tauchen hier Probleme für eine Mittelwertsberechnung auf.

Aus diesem Grund werden jeder Abbildung der Ionenexperimente Tabellen beigelegt, welche Mittelwerte für den Prozentsatz der hemmenden Wirkung des Ions (% der Spikezahlabnahme) in jeder Konzentration für die Wiederholungsversuche auflisten.

Diese Prozentsätze werden anhand des Sättigungsniveaus berechnet.

Bei der mechanischen Reizung wird dabei die in der Standardlösung höchste erreichte Impulszahl als 100% angenommen, und die Abnahme oder Zunahme unter Ioneneinfluß in Prozent berechnet.

Beim elektrischen Reiz wird die Zunahme der Spikes bis zur Sättigung unter anodischer Vorpolarisation bei mittlerer mechanischer Reizung als Maßstab genommen.

2.9.2. Nervenleitzeit und Transduktionszeit des Rezeptors

Die Nervenleitzeit wurde experimentell nach der in Kapitel 2.3.2. beschriebenen Methodik ermittelt, indem die Aktionspotentiale der Nervenableitung und gleichzeitig die Impulse der Hautableitung registriert wurden.

Aus den so gewonnenen Oszillographenbildern wurde dann der Abstand beider Impulsableitungen gemessen (Amplitudenmaximum zu Amplitudenmaximum, da der Impuls der Hautableitung nicht unbedingt direkt am Spikeanfang getriggert werden kann).

Durch die Messung des Abstands der Ableitstellen zueinander kann dann die Nervenleitzeit n berechnet werden (Kap. 3.5. Ergebnisse), d.h. die Fortleitungszeit des Impulses von seinem Entstehungsort (nach der synaptischen Übertragung) bis zur Ableitstelle.

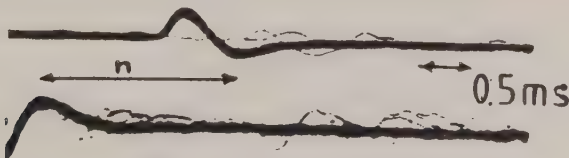


Abb. 11. Originalaufzeichnung. ($0,9 \text{ cm} \approx 0,5 \text{ ms}$)

Oberer Strahl: Ableitung vom Nerv
unterer Strahl: Ableitung von der Haut
Der Pfeil gibt die Nervenleitzeit n an.
5-10 Strahlenüberläufe im Oszillographen
wurden übereinander photographiert.

Da durch die verlängerte Impulsdauer bei niedrigen Temperaturen (siehe Ergebnisse Kap. 3.5.) das Amplitudenmaximum des Aktionspotentials nur schwer bestimmt werden kann, wurden in diesen Fällen Einzelüberläufe des Oszillographenstrahls photographiert und der Abstand von Impulsbeginn zu Impulsbeginn gemessen.



Abb. 12. Originalaufzeichnung zur Messung der Nervenleitzeit n

oberer Strahl: Ableitung vom Nerv
unterer Strahl: Ableitung von der Haut

Der Pfeil gibt den gemessenen Abstand an (Nervenleitzeit n)

$n = 2,7 \text{ ms}$

Die Nervenleitzeiten wurden aus Mittelwerten von 15 - 20 Einzelmessungen bei jeder Temperatur bestimmt. Daraus ist ersichtlich, daß die Streuung der Meßpunkte mit abnehmender Temperatur zunimmt (s. Abb. 13).

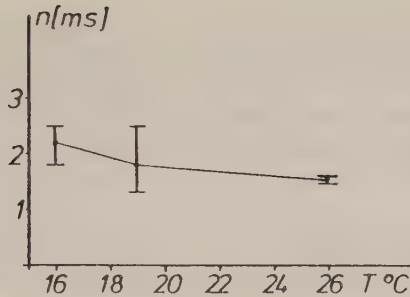


Abb. 13. Abhängigkeit der Nervenleitzeit von der Temperatur.
Abstand Organ-Ableitstelle : 3 cm
Mittelwerte und Standardabweichungen
aus 8 Messungen.

Nach der Bestimmung der Nervenleitzeit n wurde der Re-
zeptor zur Bestimmung der Transduktionszeit r elektrisch
gereizt, und die Latenz vom Reizbeginn bis zum ersten
Aktionspotential in der Antwort auf diesen Reiz gemessen.

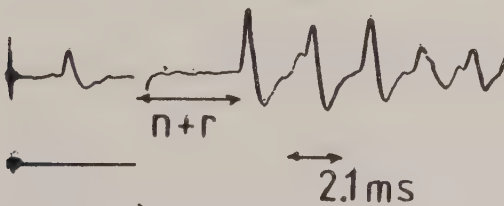


Abb. 14. DC-Stimulation des Rezeptors ($1\text{cm} \hat{=} 2,1\text{ms}$)
Der Pfeil gibt die gemessene Latenz vom Reiz-
beginn bis zum ersten Nervenimpuls in der Ant-
wort an ($n+r = 4\text{ms}$).

Die gemessene Latenz beinhaltet die Nervenleitzeit n , sowie die Transduktionszeit r des Rezeptors ($n+r$).

Nach Messung von n kann dann durch $(n+r)-n$ die Transduktionszeit berechnet werden (s. Abb.35., Abb.36., Abb.37.).

Für diese Messungen konnten nur Präparate mit eindeutiger Einzelfaserunterscheidung verwendet werden, da sichergestellt werden mußte, daß die gemessene Nervenleitzeit n und das gemessene $n+r$ zur gleichen afferenten Nervenfasern des Rezeptors gehörten.

Ob sich die Transduktionszeit r mit abnehmender Temperatur verlängert, konnte nicht belegt werden, da durch die starke Streuung der Nervenleitzeit n bei niedriger Temperatur geringfügige Änderungen von r mit dieser Methode nicht mehr bestimmt werden können.

2.10. Histologische Methoden

Da der Nerv, welcher die freien Neuromasten beim Aal innerviert, morphologisch und histologisch noch nicht beschrieben wurde, wird in Kapitel 3.2. ein Querschnitt dieses Nerven mit dem Querschnitt des Nervus lateralis posterior verglichen.

Diese Querschnitte wurden nach folgenden histologischen Methoden angefertigt:

a) Fixierung nach Weihe

1,5% Glutaraldehyd

1,5% Formaldehyd

2,5% PVP (Polyvinylpyrrolidon)

2 mM CaCl_2

0,1 Mol Na-cacodylate Puffer

1 Stunde bei 4°C in Lösung fixieren

b) Auswaschen: Na-cacodylate Puffer 0,1 mMol

c) Kontrastieren: 1% OsO_4 , 1 Stunde

d) Auswaschen in Na-cacodylate Puffer

e) Alkoholreihe:

50% 15 Minuten

70% über Nacht, 4°C

80% 20 Minuten

90% 20 Minuten

96% 20 Minuten

Iso 60 Minuten

Methylbenzoat I 1 Stunde
Methylbenzoat II 24 Stunden

f) Einbettung : Paraplast
Iso : 45°C, 60 Minuten

Paraplast I / Iso 50:50 , 60 Minuten
Paraplast II 1/2 - 1 Tag
Paraplast III 1/2 - 1 Tag.

3. Ergebnisse

3.1. Vorversuche

3.1.1. Das Potential über der Haut

Für die Versuchsreihen, in welchen die Reaktion des Rezeptors auf elektrische Reizung getestet wurde, ist es sehr wichtig zu wissen, wieviel von der angelegten Spannung tatsächlich über den Rezeptoren (über der Fischhaut) abfällt.

Nach der verwendeten Reizanordnung fällt ein großer Teil der angelegten Spannung über dem Stabilisationswiderstand ab, der Rest verteilt sich auf Elektroden, Lösung und Fischhaut (s. Abb. 16).

Die folgenden Eichkurven sollen drei noch offenstehende Fragen beantworten:

1. Die Größe des Fischhaut-Widerstandes
2. Die Stabilität des Fischhaut-Widerstands gegenüber der elektrischen Vorpolarisation
3. Die Änderung des durch elektrische Reizung hervorgerufenen Potentials über der Haut in hochmolaren Lösungen (durch erhöhte Leitfähigkeit oder eventuelle Änderung des Hautwiderstands).

Zur Bestimmung des Fischhautwiderstandes wurde zuerst der Potentialabfall am Stabilisationswiderstand S (Abb. 15.) gemessen, dann der Potentialabfall über der Haut (Abb. 18.).

Aus diesen Meßdaten konnte dann der Fischhautwiderstand berechnet werden.

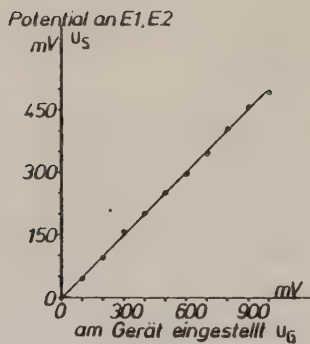


Abb. 15. Spannungsabfall U_s über dem Stabilisationswiderstand R_s als Funktion des Potentials an den Elektroden E_1, E_2 .
Abszisse: Die am Reizgerät eingestellte Spannung U_g . (s.a. Abb.16, Meßanordnung I).

Aus der Abb. 15 ist ersichtlich, daß die Hälfte der angelegten Spannung über dem Stabilisationswiderstand abfallen, die anderen 50% der Spannung fallen über den restlichen Widerständen der Reizanordnung ab ($R_{e_1} + R_{e_2} + R_f + R_l$, s. Abb. 16).

Für die Reizelektroden konnte ein Widerstand von ca. 30 k Ω mittels eines Ohmmeters bestimmt werden.

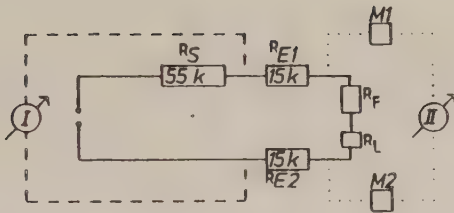


Abb. 16. Ersatzschaltbild der Meßanordnung zur Bestimmung der Spannungsverhältnisse aus Abb. 15, 17 u. 18.

R_S : Stabilisationswiderstand
 $R_S + R_E$: Elektrodenwiderstände
 M_1, M_2 : Messelektroden
 R_F : Widerstand der Fischhaut
 R_L : Widerstand der Lösung
 Messanordnung I=Abb. 15, II=Abb. 18.

Um das durch den Reiz hervorgerufene Potential über der Haut messen zu können, wurde eine Meßelektrode M_1 unter die Fischhaut bis unter das zu reizende Organ geschoben, die zweite über dem Organ fixiert. Die Reizelektroden wurden in ihrer Position belassen.

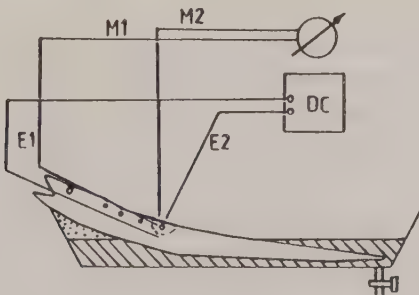


Abb. 17. Meßanordnung zur Messung des Hautpotentials

M_1, M_2 : Meßelektroden
 E_1, E_2 : Reizelektroden

Nach der Messanordnung der Abb.17, kann nur der Spannungsabfall über der Fischhaut und der Lösung bestimmt werden ($U_f + U_1$). Aus diesem Grund wurde eine zweite Messung zur Bestimmung des Lösungswiderstandes allein gemacht, indem die Meßelektrode M_1 aus dem Fisch entfernt wurde und neben den Reizelektroden in der Lösung fixiert wurde.

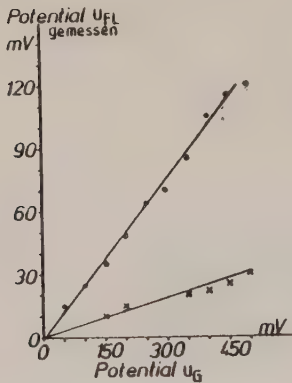


Abb.18. Die über der Haut und Lösung abfallende Spannung
 -●- Fischhaut+Lösung $U_f + U_1$
 -x- Lösung allein U_1
 (2 mM CaCl_2)

Aus den Punkten der beiden vorangegangenen Abbildungen 15 und 18 ergeben sich Geraden (Ausgleichsgeraden), deren Steigungen experimentell ermittelt worden waren: (Bei einer angelegten Gesamtspannung $U_g = 250$ mV ergibt sich aus Abb.15, für die über dem Stabilisationswiderstand abfallende Spannung $U_s = 125$ mV, aus Abb.18, die über Fischhaut + Lösung abfallende Spannung $U_{f1} = 62$ mV, für die Lösung allein $U_1 = 16$ mV)

$$\frac{U_1}{U_g} = \frac{16}{250} = 0.064 \quad \frac{U_{f1}}{U_g} = \frac{62}{250} = 0.248 \quad \frac{U_s}{U_g} = \frac{125}{250} = 0.5$$

Aus diesen Verhältnissen können nun die Widerstände berechnet werden, da der Spannungsabfall nach dem Ohmschen Gesetz proportional den Widerständen ist:

$$R_s = 55 \text{ k}\Omega = R_{e_1} + R_{e_2} + R_f + R_1 \quad \text{d.h. } R_g = 110 \text{ k}\Omega$$

$$\frac{R_{f1}}{R_g} = 0.248 + R_{f1} = 27 \text{ k}\Omega ; \frac{R_1}{R_g} = 0.064 + R_1 = 7 \text{ k}\Omega$$

$$R_{f1} = R_f + R_1 + R_f = 20 \text{ k}\Omega$$

$$\text{Test: } U_{f1} + U_{e_{1,2}} = U_g - U_s \quad R_{f1} + R_{e_{1,2}} = R_s + R_{e_{1,2}} = 28 \text{ k}\Omega$$

Ermittelt wurde ein Widerstand von 30 k Ω für die beiden Elektroden. Die Differenz von 2 k Ω bewegt sich innerhalb der Messfehlergrenzen.

Durch die Messungen der Abbildungen 15-18 konnten die beiden ersten Punkte, welche in der Einleitung dieses Kapitels angesprochen wurden, geklärt werden:

- 1) Der Fischhautwiderstand beträgt 20 k Ω
- 2) Die Spannung, welche über der Fischhaut abfällt, nimmt linear mit der Erhöhung der Reizintensität zu.

Da in manchen Experimenten hochmolare Lösungen im Wechsel mit niedermolaren Lösungen appliziert wurden, bleibt noch zu klären, ob auch in diesen stark leitfähigen Lösungen die über der Fischhaut angelegte Spannung mit der Spannung, die in niedermolaren Lösungen über den Organen liegt, vergleichbar ist.

Das folgende Experiment geht dieser Frage nach.

Die Versuchsanordnung entspricht der in Abb. 17.

Folgende Punkte sollen geklärt werden:

- 1) Die Änderung des Potentials über der Haut mit zunehmender Molarität des Außenmediums und elektrischer Vorpolarisation.
- 2) Die Änderung des Potentials über der Haut mit der Entfernung der Reizelektroden voneinander.

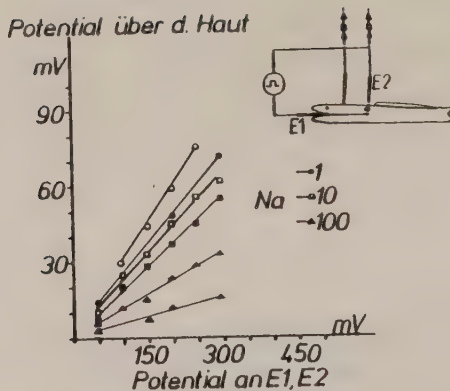


Abb. 19. Abhängigkeit des Hautpotentials von der Position der Reizelektrode E_2 und von der Ionenkonzentration der Lösung

—○ 1 mM NaCl, —◻ 10 mM NaCl, —◻ 100 mM NaCl

Die Abbildung 19. zeigt, daß das Hautpotential über dem Organ mit der Entfernung der Reizelektrode E_2 abnimmt. Außerdem nimmt das Hautpotential bei gleicher angelegter Spannung mit Zunahme der Molarität der Lösung (und somit stark erhöhter Leitfähigkeit) ab.

Durch diese Tatsache können die flacher verlaufenden Reiz-Antwort-Kurven bei hohen Ionenkonzentrationen (s. Kap.3.6., Abb.38., Abb.43., Abb.44., Abb.47.) erklärt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Position der Reizelektroden innerhalb einer Versuchsreihe nicht verändert.

Da die mechanische Reizstärke im Rahmen des verwendeten Reizspektrums linear zunimmt, kann ausgeschlossen werden, daß die Sättigungen der Reiz-Antwort-Kurven (Abb.27 a., Abb.27 b., Kap.3.4.) durch Überlastung des mechanischen Reizsystems verursacht werden.

Der Schwingerreger diente der Bewegung des Spritzenstempels für die Strömungsreize.

3.1.2. Die Trennung der Antworten der beiden afferenten Fasern bei den freien Neuromasten

Wie bereits im Kapitel 2.3. beschrieben wurde, ist es selten möglich, den Reizwinkel des mechanischen Reizes so optimal zu treffen, daß nur eine der beiden afferenten Fasern auf den Reiz antwortet (Versuchsanordnung Abb.4.).

In den beiden folgenden Beispielen wurden die Antworten beider Fasern auf steigende mechanische Reize und kathodische, sowie anodische Vorpolarisation getrennt ausgewertet.

Die folgenden Originalaufzeichnungen zeigen die Reaktion der beiden Fasern auf Strömungsreize zunehmender Stärke und auf kathodische, sowie anodische Vorpolarisation:

mechanische Reizung:



1 rel. E.



2 rel. E.



8 rel. E.



mechanischer Reiz: 2 rel.E. (Pfeil)

anodische Vorpolarisation

kathodische Vorpolarisation

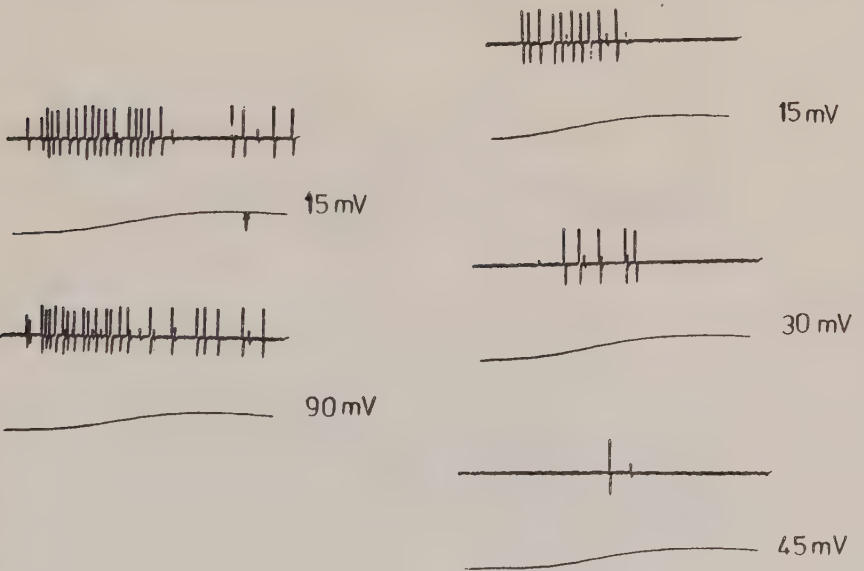


Abb. 20a.: 8 Originalaufzeichnungen zu Abb. 20b.
3 verschiedene mechanische Reizstärken (S.52)
Gleichbleibender mechanischer Reiz und zu-
sätzliche Vorpolarisation (S.53).

Aus der Meßreihe der vorangegangenen Originalbilder wurden folgende Kurven ausgewertet:

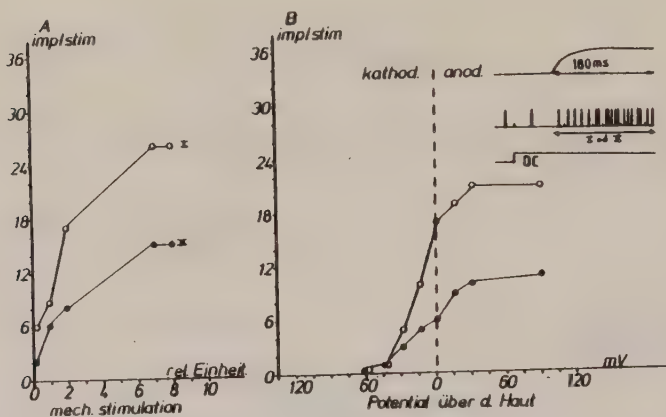


Abb. 20 b. Beide Fasern (I,II) wurden getrennt ausgewertet (s. Originalbilder Abb. 20.a.) (ein Beispiel aus 3 Versuchsreihen)

A : Abhängigkeit der Impulszahl von der mechanischen Reizstärke

B : Abhängigkeit der Impulszahl von der DC-Polarisation zusätzlich zu einem mittleren mechanischen Reiz

(Versuchsanordnung Abb.4.).

Obwohl der verwendete Strömungsreiz in nur einer Reizrichtung appliziert wird, antworten beide Fasern mit Impulszahlerhöhung.

Die Kurve der Faser I ist in beiden Meßreihen (mechanische Stimulation Abb.20 b.A., elektrische Stimulation Abb. 20 b.B.) steiler als die der Faser II.

Auf die Tatsache, daß beide Fasern auf den mechanischen Reiz antworten, wird noch näher in der Diskussion eingegangen werden.

Die Antworten beider Fasern unterscheiden sich jedoch nur in quantitativer Hinsicht. Beide antworten mit steigender Impulszahl auf steigenden mechanischen Reiz bis zu einer Sättigung.

Anodische Vorpolarisation führt ebenso zu zunehmender Impulszahl bis zu einem Sättigungsplateau, kathodische Vorpolarisation führt zur Abnahme der Aktionspotentiale bis auf 0.

Beide Kurven unterscheiden sich jedoch in ihrer Steigung.

Ist der mechanische Reizwinkel so gewählt, daß beide Fasern getrennt reagieren, dann sind ihre Reiz-Antwort-Kurven fast identisch.

Dies wird anhand eines Beispiels für einen Sinusreiz mit zusätzlicher elektrischer Vorpolarisation demonstriert:

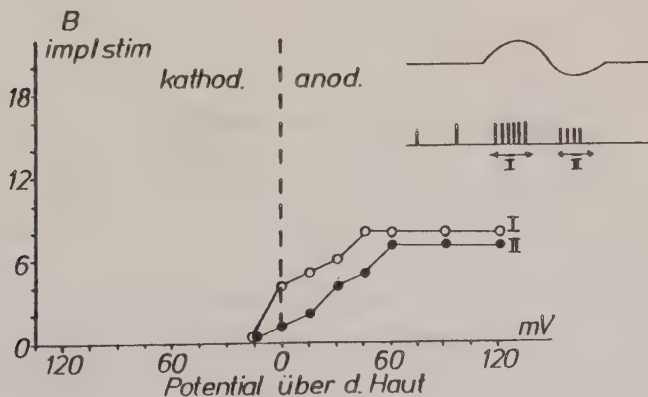


Abb. 21 a. Die Abhängigkeit der Impulszahl auf kathodische und anodische Vorpolarisation zusätzlich zu einem mittleren mechanischen Sinusreiz. Beide Fasern (I, II) wurden getrennt ausgewertet. Zeitfenster (waagrechte Pfeile) je Faser 45 ms

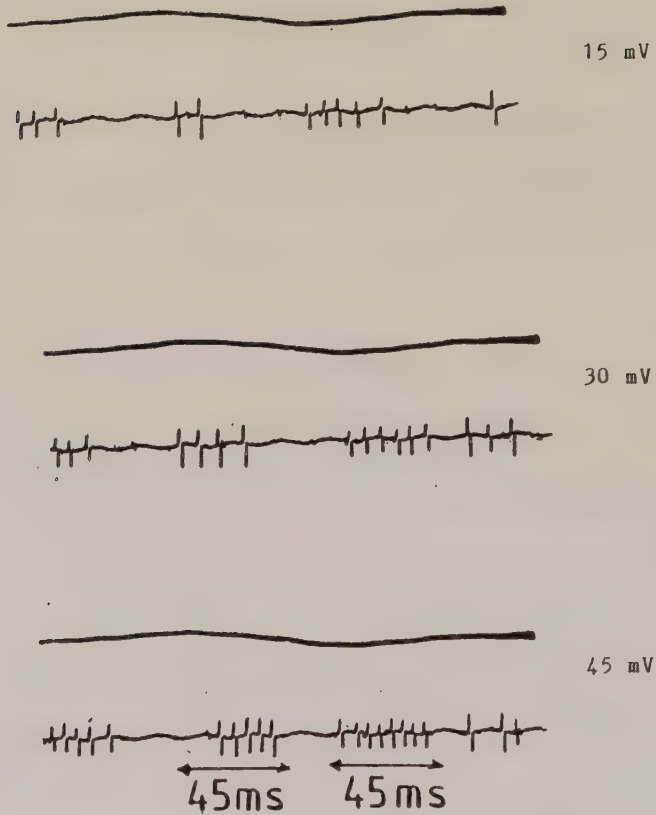


Abb. 21 b. Originalaufzeichnungen zu Graphik 21.a.

3 Beispiele : mittlerer Sinusreiz und
anodische Vorpolarisation
(15 mV, 30 mV, 45 mV)

Da gezeigt werden konnte, daß beide Fasern eines Organs in gleicher Weise auf mechanische oder elektrische Stimulation reagieren, und nicht anzunehmen ist, daß die applizierten Ionen (Kap. 3.6.) in unterschiedlicher Weise auf die Haarzellen beider Orientierungsrichtungen reagieren, ist es unerheblich, ob als Auswertmethode der folgenden Ionenexperimente eine Einzelfaserauswertung oder die Auswertung beider Fasern zugrunde gelegt wird.

Trotzdem wurden möglichst nur Einzelfaserauswertungen verwendet.

Die Auswertmethode wird bei jeder Abbildung angegeben.

3.1.3. Ca^{2+} -Diffusion aus dem Fisch

Da der Einfluß von verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen auf die Rezeptoren untersucht wurde, mußte gemessen werden, wieviel Ca^{2+} eventuell aus dem Fischschleim und der Fischhaut in die Testlösung diffundieren.

Nach der in Kapitel 2.8.4. beschriebenen Titrationsmethode konnten folgende Daten gewonnen werden:

Das Aquarienwasser, in dem die Fische gehalten werden, enthält 2 mM Ca^{2+} .

Wenn man den immobilisierten Fisch ca. 1 Stunde in 1l dieses Wassers beläßt, so kann ein Ca^{2+} -Gehalt von 2,6 mM Ca^{2+} gemessen werden..

Läßt man den Fisch jedoch 1 Stunde in Aqua dest., dann kann in dieser Lösung ein Ca^{2+} -Gehalt von 1,6 mM festgestellt werden.

Durch eine Versuchstitration mit bekanntem Ca^{2+} -Gehalt, konnte ein Fehler von 0,25 mM Ca^{2+} bei dieser Titrationmethode errechnet werden.

Man muß in späteren Experimenten (Kap.3.6.) also davon ausgehen, daß selbst bei der Verwendung von Ca^{2+} -freien Testlösungen noch ein bestimmter Prozentsatz Ca^{2+} aus dem Fisch in die Lösung diffundiert.

Eine genaue Konzentrationsangabe des Ca^{2+} -Gehalts in den verwendeten Testlösungen kann also nicht gemacht werden.

3.1.4. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Die Reproduzierbarkeit eines Ergebnisses innerhalb einer Versuchsreihe, welche an ein und demselben Organ durchgeführt wird, ist geringen Streuungen unterworfen.

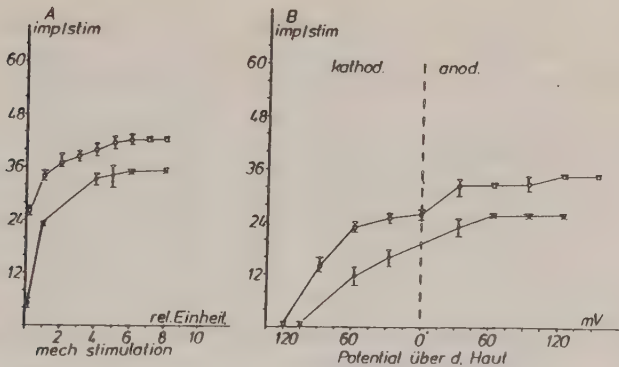


Abb. 22 a. Freier Neuromast: zwei Fasern
a. Streuung der Ergebnisse bei der mehrfachen Wiederholung des gleichen Versuchs am selben Rezentor (5 x).
-○ 2 mM CaCl_2
-● 2 mM CaCl_2 + 0.1 mM LaCl_3

Die Balken über den einzelnen Meßpunkten zeichnen die gemessenen Minimal- und Maximalwerte an.

Reizstärke	mech.		Reizstärke	elektrisch	
				kathod.	anod.
spn.	0,82		0	0,7	0,7
1	1,0		30	0,7	1,3
2	1,3		60	0,7	0,0
3	0,71		90	1,3	1,3
4	0,71		120	0,0	0,0
5	1,0				
6	0,7				
7	0,0				
8	0,0				
spn.	0,82		30	2,05	2,05
1	0,0		60	2,05	0,0
4	1,3		90		0,0
5	2,05		105	0,0	
6	0,0		120	0,0	0,0
8	0,0				

Abb. 22 b. Standardabweichungen der verschiedenen Meßpunkte aus Abb. 22.a. in denselben rel.E.

Die geringen Streuungen (Abb. 22 a.) und Standardabweichungen (Abb. 22 b.) beweisen eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse am gleichen Rezeptor.

Da verschiedene Rezeptoren starke Unterschiede in ihrer Empfindlichkeit aufweisen, müssen beim Vergleich von Experimenten an mehreren Rezeptoren größere Standardabweichungen erwartet werden (siehe in Kap. 3.6. die jeweiligen Tabellen für die Wiederholungsversuche).

3.2. Histologie

Nach der in Kapitel 2.10. beschriebenen Methode wurden folgende histologische Nervenquerschnitte angefertigt, um den Nervus lateralis posterior mit dem Nerv der freien Neuromasten, dem Nervus lateralis superior zu vergleichen.

Der Querschnitt des Nervus lateralis posterior erfolgte zwischen dem 56. und 57. Organ.

Aus der Abbildung 23 a können 447 Nervenfasern ausgezählt werden. Bei 56 Organen, welche dieser Nerv zu versorgen hat, wird somit jedes Organ von 8 Fasern innerviert (s.a. Alnaes 1972).

Bei einigen Fischen versorgen jedoch Äfferenzen aus dem Nervus lateralis auch freie Neuromasten neben dem Seitenlinienkanal (Harder 1965). Dies wurde beim Aal nicht untersucht.

Aus dem Nervenquerschnitt des Nervus lateralis superior (Abb. 23 b.) können 37 Nervenfasern ausgezählt werden. Bei einer Innervation von 7 Organen fallen somit jedem Organ 5 Fasern zu.

Da aus histologischen Arbeiten bekannt ist (Flock 1967), daß jedes Organ der freien Neuromasten von zwei afferenten Fasern versorgt wird, muß es sich bei den restlichen Fasern um Efferenzen handeln.

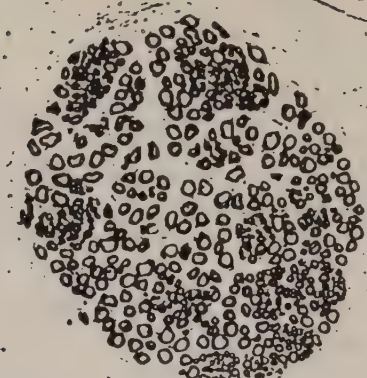


Abb.23 a. Querschnitt durch den Nervus lateralis posterior (Seitenliniennerv).
Vergrößerung: x 192
Innervation: 56 Kanalorgane
Schnitt: 3 μ

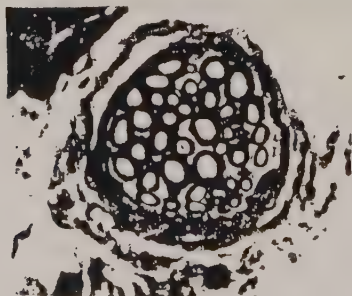


Abb. 23 b. Querschnitt durch den Nervus lateralis superior (freie Neuromasten).
Vergrößerung: x 378
Innervation: 7 Neuromasten
Schnitt: 7 μ



Abb. 23.c. Querschnitt durch ein Kanalorgan

3.3. Das Hautpotential unter dem Einfluß verschiedener Ionen und seine Wirkung auf die Empfindlichkeit der Rezeptoren

Die Hautpotentialänderungen nach Applikation verschiedener Ionenlösungen wurde getestet (Methodik Kap. 2.5.), um sicherzugehen, daß die Rezeptoren durch das Ion selbst und nicht nur durch das veränderte Hautpotential beeinflußt werden.

Aus der folgenden Abbildung ist ersichtlich, daß sich das Hautpotential von 4-8 mV (Fisch-innen positiv) in 1 mM KCl, 1 mM NaCl und 100 mM CaCl₂ um 2-3 mV ändert, in 100 mM KCl und 100 mM NaCl um 20-30 mV.

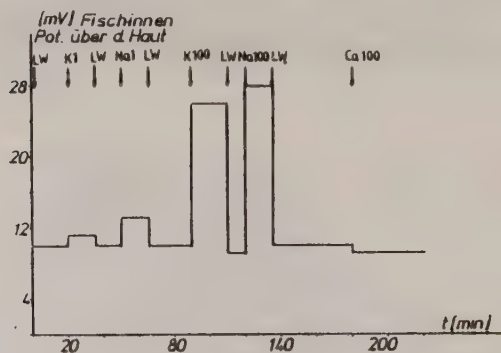


Abb. 24. Hautpotentialänderung in 1mM KCl, 1 mM NaCl, 100 mM KCl, 100 mM NaCl und 100 mM CaCl₂.
Standardlösung: Leitungswasser
Mittelwerte aus 3 Messungen

Wird der Fisch soweit aus der Lösung gehoben, daß sich die Kiemen außerhalb der Lösung befinden, dann ändern sich die Ergebnisse der Abbildung 24 um ± 2 mV.

10 mM CoCl_2 und 1 mM LaCl_3 ändern das Hautpotential um 10-12 mV, wobei nun das Fischinnere negativ wird.

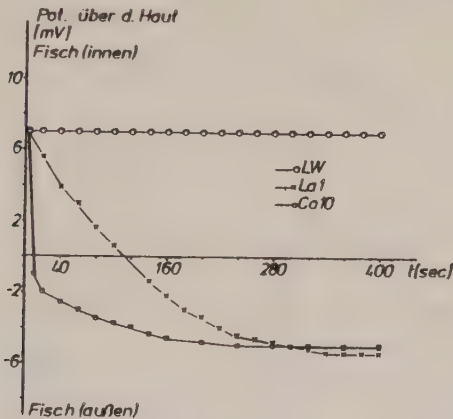


Abb. 25. Die Änderung des Hautpotentials nach Applikation von 1 mM LaCl_3 und 10 mM CoCl_2 .
Standardlösung: Leitungswasser
Mittelwerte aus 2 Messungen.

Die einzelnen Messungen der Abbildungen 24 und 25 wiesen Differenzen von nur 1-2 mV auf.

Aufgrund der geringen Veränderungen des Hautpotentials nach der Ionenapplikation wurden diese in späteren Experimenten vernachlässigt.

Um durch weitere Ergebnisse abzusichern, daß das Hautpotential keinen Einfluß auf die Empfindlichkeit der

Rezeptoren nimmt, wurde

- a) die Haut über dem Organ mit zwei Silberchloridelektroden kurzgeschlossen und gleichzeitig die Spontanaktivität, sowie die Mechanosensitivität gemessen,
- b) die Haut nahe dem Organ (1 mm Abstand) mit tiefen Schnitten durchtrennt.

Der Kurzschluß der Fischhaut erfolgte mittels zweier chlorierter Silberdrähte ($\varnothing 1\text{mm}$, $R_{1+2} = 300\Omega$).

Der Nullwert wurde durch Kurzschließen der beiden Ableit-elektroden bestimmt.

(Versuchsanordnung Abb.16., Kurzschlußelektroden = E_1, E_2 , Meßelektroden = M_1, M_2).

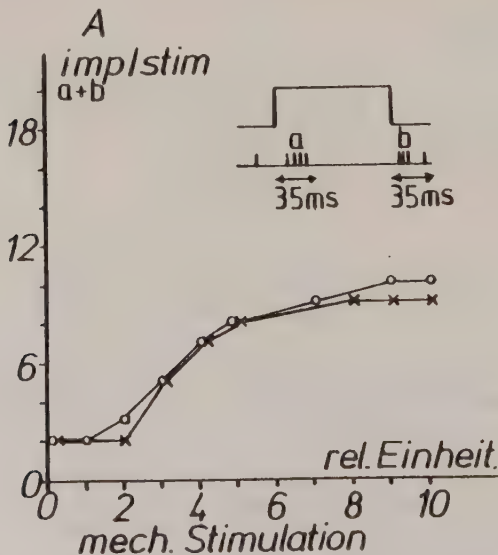


Abb. 26a. Anzahl der Aktionspotentiale als Antwort auf steigende mechanische Reizung
Kanalorgan: Einzelfaser

Kurzschluß der Haut von 6mV auf 0 mV
o- Hautpotential 6 mV (vor Kurzschluß)
x- Hautpotential 0 mV (nach Kurzschluß)
mechanischer Reiz : Erschütterungsreiz
(Einzelbeispiel aus 3 Messungen)

Die Abbildung beweist, daß der Kurzschluß der Haut keinen Einfluß auf die Mechanosensitivität der Organe hat, da vor sowie nach dem Kurzschluß die durch den gleichen Reiz ausgelöste Impulszahl stabil bleibt.

Für den in Abbildung 26 b dargestellten Versuch wurde die Haut etwa 1 mm neben dem Organ durch drei tiefe Schnitte durchtrennt.

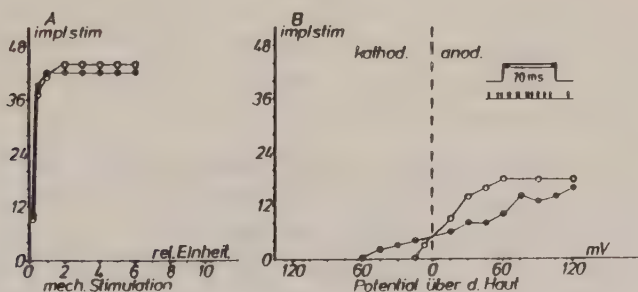


Abb. 26 b. Mechanische (A) und elektrische (B) Stimulation vor (—○—) und nach (—●—) der Durchtrennung der Haut neben dem Organ.

freier Neuromast; beide Fasern wurden ausgezählt.

Durch diese Schnitte bricht der Hautwiderstand zusammen. Der Potentialabfall über der Haut ist aus diesen Gründen, bei gleicher angelegter Spannung, wesentlich geringer als bei intakter Haut.

Aus diesen Gründen verläuft die Reiz-Antwort-Kurve (Abb. 26 b. B) nach durchtrennter Haut wesentlich flacher.

Die mechanische Empfindlichkeit bleibt unbeeinflusst.

3.4. Die Antwort der Organe auf mechanische und elektrische Stimulation

3.4.1. Die Empfindlichkeit der Rezeptoren

Die Empfindlichkeit der Rezeptoren gegenüber mechanischer Reizung variiert von Organ zu Organ relativ stark und ist außerdem von der Reizform (Erschütterungsreiz oder Strömungsreiz) und von der Reizrichtung abhängig.

Nach Hudspeth (1983) ist "die Reaktion der Haarzelle umso größer, je weiter sich die Achse der Auslenkung der Symmetrieachse der Zelle nähert".

Reiter (1984) fand in seiner Diplomarbeit eine optimale Reizrichtung von oben senkrecht auf den Fisch für die freien Neuromasten.

Die in dieser Arbeit verwendeten Reizformen lassen jedoch keinen eindeutigen Schluß über die genaue Reizrichtung der schließlich am Organ ankommenden Reize zu (Spritzenausgang 0.5 cm!).

Die ermittelte optimale Reizrichtung lag in dieser Reizform bei den freien Neuromasten senkrecht zur Medianebene des Fisches (Strömungsreize), was auch der in der Literatur beschriebenen Orientierung dieser Zellen entspricht (Hama 1978).

Bei den Kanalorganen konnte die höchste Reizantwort erzielt werden, wenn der Plastikstab senkrecht über den Poren des Kanals fixiert war (s.a. Methodik, Kap. 2.4.1.).

Die beiden afferenten Fasern, welche einen freien Neuromasten innervieren, antworten auf entgegengesetzte Reizrichtungen, wobei jede Faser alle Zellen eines freien Neuromasten versorgt, welche die gleiche Orientierung ihres Kinoziliums haben (s. Abb. 1).

Wenn die Haarzellen einer Orientierungsrichtung gereizt werden, dann werden die Zellen der entgegengesetzten Orientierung gehemmt (Hudspeth 1983).

Diese Richtungsspezifität ist auch bei Kanalorganen bekannt (Flock 1967).

Für die in der folgenden Abbildung dargestellte Messung wurde die Empfindlichkeit der Kanalorgane gegenüber mechanischen Erschütterungsreizen und gegenüber elektrischer Vorpolarisation getestet.

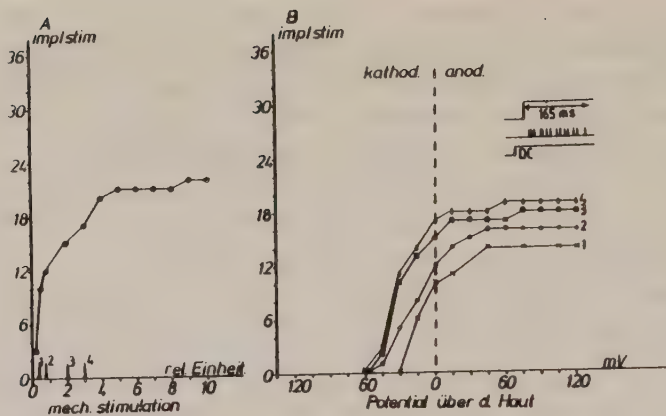


Abb. 27 a. Die Anzahl der Aktionspotentiale einer Einzelfaser als Antwort auf mechanische und elektrische Reizung

Kanalorgan : Einzelfaserpräparation

A : Anzahl der Impulse in Abhängigkeit von der mechanischen Reizstärke (Erschütterungsreize)

B : Anzahl der Impulse als Antwort auf vier verschiedenen mechanischen Reizstärken in Abhängigkeit von zusätzlicher elektrischer Reizung

1, 2, 3, 4 : Die in B verwendeten mechanischen Reizstärken, welche in A markiert sind.

Einzelbeispiel aus 5 Messungen
(siehe auch Abb.39., Abb.40.)

Abbildung 27 a zeigt, daß die Impulszahl von der Höhe des mechanischen Reizes abhängt, wobei die Reiz-Antwort-Kurve in die Sättigung geht.

Die Antwort auf einen mittleren mechanischen Reiz kann durch anodische Vorpolarisation (Fisch-innen negativ) auch bis zu einem Sättigungsniveau erhöht werden, wel-

ches von der Stärke des mechanischen Reizes abhängt.

Somit hat die elektrisch verstärkte Antwort eines jeden mechanischen Reizes ihr eigenes Sättigungsplateau (s.a. Abb.39., Abb.40.).

Kathodische Vorpolarisation (Fisch-innen positiv) reduziert die Impulszahl, wobei auch Antworten auf starke mechanische Reize völlig unterdrückt werden können (bei hohen DC-Polarisationen), aber durch anodische Polarisation nicht mehr erhöht werden können, wenn sich die Antwort auf den mechanischen Reiz bereits in der Sättigung befindet (Abb.27 b.).

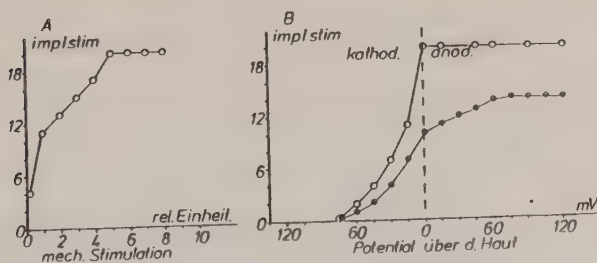


Abb. 27 b. Kanalorgan : Abhängigkeit der Impulsantwort auf starke mechanische Reizung (Sättigung) auf zusätzliche DC-Polarisation.

A : mechanische Reizung

B : 2 mechanische Reize und zusätzliche DC-Polarisation

(Mittelwertskurve aus 10 Messungen)

In gleicher Weise kann auch die Spontanaktivität beeinflusst werden.

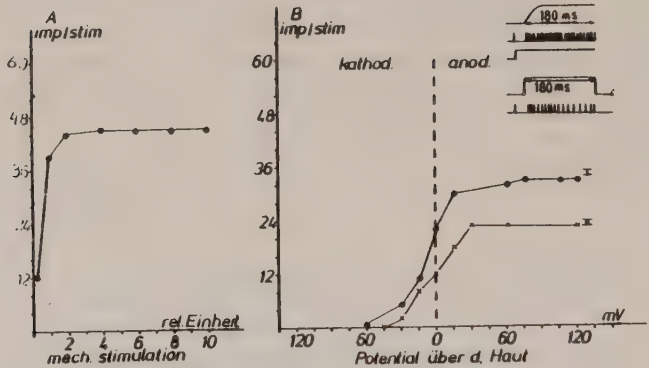


Abb. 28. Freier Neuromast:

A. Abhängigkeit der Impulszahl von der mechanischen Reizstärke (Strömungsreiz).

Es wurde ein Zeitfenster von 180 ms ausgezählt (beide Fasern des Neuromasten).

B. I. mittlerer mechanischer Reiz und elektrische DC-Polarisation

II. Spontanaktivität und elektrischer Reiz.

3.4.2. Ermüdung nach elektrischer Dauerreizung

Die elektrische Reizung als Vorpolarisation der Haut wurde im allgemeinen über eine Zeitdauer von ca. 2 Sekunden und mit einer Reizintensität von 15 - 150 mV über der Haut angewendet.

Ein elektrischer Dauerreiz von über einer Minute löst während dieses ganzen Zeitraumes eine tonisch-konstante Antwort aus.

Erst nach 60 - 80 Sekunden findet eine Ermüdung statt.

Diese Ermüdung ist abhängig von der Höhe und der Dauer des Reizes.

Bei hohen anodischen Reizen kann bereits nach 60 Sekunden eine Abnahme der Impulsantwort beobachtet werden.

Bei kathodischer Reizung nimmt die Antwort nach längerer Reizdauer wieder zu (schwacher Reiz).

Bei stärkeren Reizen bleiben alle Impulse über lange Zeitdauer unterdrückt (45 mV).

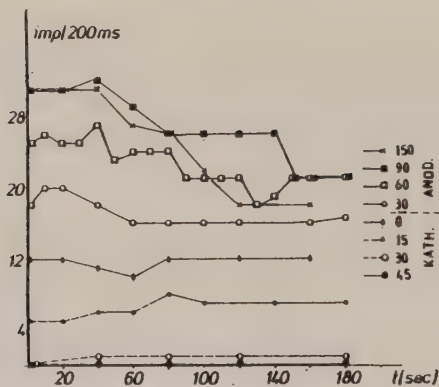


Abb. 29. Freier Neuromast (Einzelfaser)

Spontanaktivität bei elektrischer Dauerreizung.

Potential über der Haut:

anodisch: 30 mV, 60 mV, 90 mV, 150 mV,

kathodisch: 15 mV, 30 mV, 45 mV.

Es wurde jeweils ein Zeitraum von 200 ms ausgezählt.

(Einzelbeispiel aus 3 Messungen).

3.4.3. Starke elektrische Reizung

Innerhalb der angewendeten Reizdauer einer elektrischen Vorpolarisation konnten stabile Antworten bis zu einer Vorpolarisationshöhe von 330 mV (Potential über der Haut) gewonnen werden.

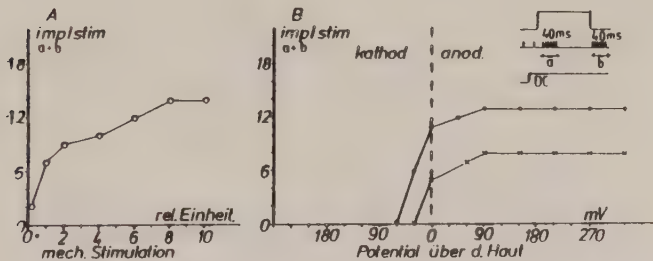


Abb. 30. Kanalorgan (Einzelfaser):

- A. Mechanischer Erschütterungsreiz
Impulszahl in Abhängigkeit von der mechanischen Reizstärke.
- B. Mechanischer Erschütterungsreiz und zusätzliche Vorpolarisation der Haut
zwei mechanische Reize wurden angewendet
($\rightarrow$ 5 rel.E., $\rightarrow$ 0.5 rel.E.)
Impulszahl abhängig von der elektrischen Vorpolarisation.
(Einzelbeispiel aus 2 Messungen)

3.4.4. Post-Stimulationspause der Spontanaktivität nach elektrischer Reizung

Die Pause, welche auf einen elektrischen Reiz bis zum Auftreten des ersten spontanen Spikes folgt, ist von der Polarität und der Höhe des vorangegangenen elektrischen Reizes abhängig.

Sie nimmt mit steigender anodischer Reizung zu und mit steigender kathodischer Reizung ab.

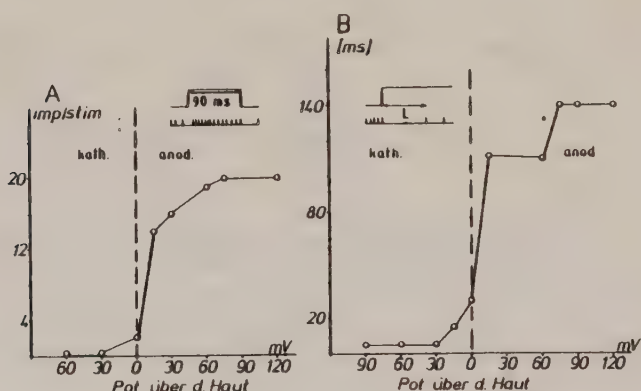


Abb. 31. Freier Neuromast (Einzelfaser):

Die nach einem elektrischen Reiz folgende Pause bis zum Auftreten des ersten spontanen Impulses.

A. Spontanaktivität auf elektrische Stimulation

B. Post-Stimulationspause nach elektrischer Reizung.

Der Pfeil im eingefügten Beispiel gibt an, welche Zeitspanne pro Reiz gemessen wurde.

(Einzelbeispiel aus 5 Messungen)

Bei maximaler Antwort auf anodische Polarisation (Sättigung) wird auch mit stärkerer elektrischer Reizung die auf den Reiz folgende Pause nicht mehr verlängert.

Ebenso ist bei vollständiger Unterdrückung der Spontanaktivität (kathodische Vorpolarisation, ab 15 mV) die Post-Stimulationspause durch stärkeren elektrischen Reiz nicht mehr zu verkürzen.

3.5. Nervenleitzeit und Transduktionszeit der Rezeptoren

Um Rückschlüsse über den Transduktionsprozess innerhalb der Rezeptorzellen ziehen zu können, wurde die Transduktionszeit r der Sinneszellen ermittelt. Sie stellt die Zeit dar, die der Rezeptor benötigt, um einen Reiz vom Zeitpunkt der Ankunft am Rezeptor bis zu seiner Umwandlung in einen Nervenimpuls weiterzuleiten.

Diese Transduktionszeit kann unter Einbeziehung der Nervenleitzeit errechnet werden.

Die Nervenleitgeschwindigkeit ist jedoch stark temperaturabhängig. Deshalb wurde die Temperaturabhängigkeit des Systems untersucht.

Nach der in Kapitel 2.3.2. beschriebenen Methodik konnten durch gleichzeitige Hautableitung (Spikeentstehungsstelle) und Nervenableitung (Ableitstelle) die Nervenleitzeiten des Nerven der freien Neuromasten bestimmt werden (Kap. 2.9.2.).

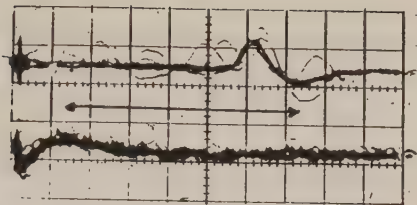
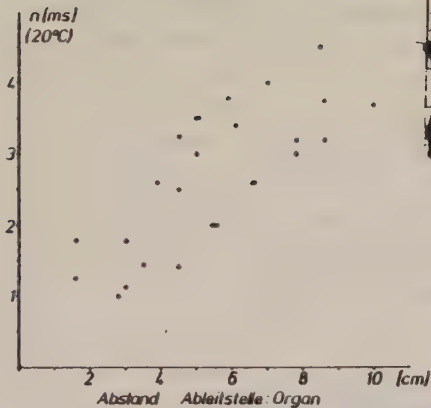
In der folgenden Abbildung sind 27 Einzelmessungen dieser Ableitmethodik zusammengefasst.

Nach Abb. 32 a. sieht es so aus, als ließen sich die Messpunkte in zwei Punktescharen aufgliedern.

Wenn man diese Punktescharen postuliert, so kann man die ihnen zugehörigen Mittelwertsgerechten berechnen und aus ihnen die Nervenleitgeschwindigkeiten ermitteln.

Man erhält somit eine schnellleitende Fasersorte mit ca. 27 m/s und eine langsamleitende mit ca. 15 m/s

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Messungen von Alnaes (1973) am Nervus lateralis.



Originalaufzeichnung:
Abstand Organ:Ableitstelle 5cm
0,7 cm = 0,5 ms

Pfeil = n

Abb. 32 a. Nervenleitzeit in Abhängigkeit vom Abstand der Ableitstelle am Nerv zum Organ. (27 Einzelmessungen)

Wenn man aus jedem Punkt der Abb. 32a. die Nervenleitgeschwindigkeit berechnet, dann erhält man die Verteilung der folgenden Abb. 32b. Berechnet man nun aus den beiden postulierten Punktescharen die Mittelwerte, so erhält man die bereits erwähnten beiden Nervenleitgeschwindigkeiten. Rechts und links sind die Standardabweichungen eingezeichnet. Daß sie sich nicht überschneiden, ist ein Indiz dafür, daß die Annahme für zwei Nervenleitzeiten eine Berechtigung hat.

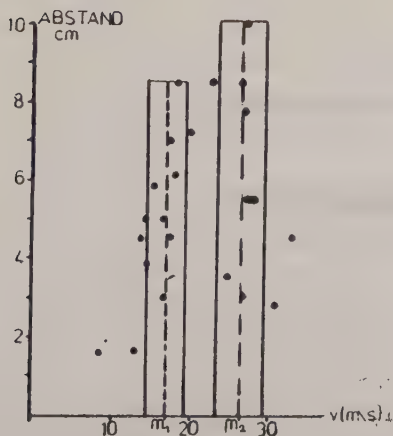


Abb. 32 b. Verteilung der Messpunkte aus Abb. 32a. Abstand Organ:Ableitstelle (Ordinate) Nervenleitgeschwindigkeit v (Abszisse) m_1, m_2 = Mittelwerte der beiden Punktescharen. Die Standardabweichungen sind als Säulen aufgetragen.

Die Streuungen der Punkte aus der Abb. 32a könnten auch durch unterschiedliche Faserdurchmesser zustande kommen. Nach der Abb. 23b sieht es jedoch so aus, als könnten die Nervenfasern in zwei Kategorien unterteilt werden.

Die Nervenleitgeschwindigkeiten sind jedoch sehr temperaturabhängig.

Die Erniedrigung der Temperatur führt zu starker Verlängerung der Impulsdauer (Abb. 33.) und zu stark verminderter Nervenleitzeit (Geschwindigkeit).

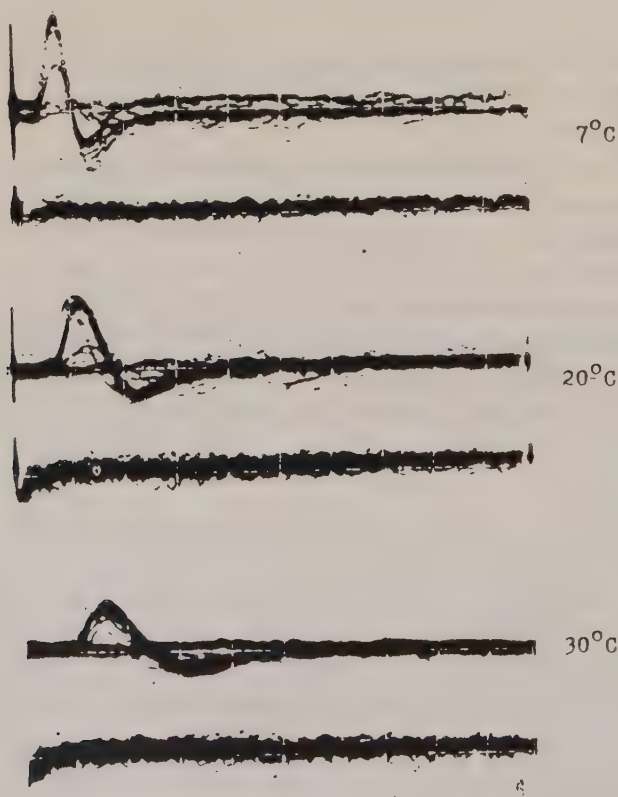


Abb. 33. Originalaufzeichnungen eines Aktionspotentials bei drei verschiedenen Temperaturen (7°C, 20°C, 30°C).

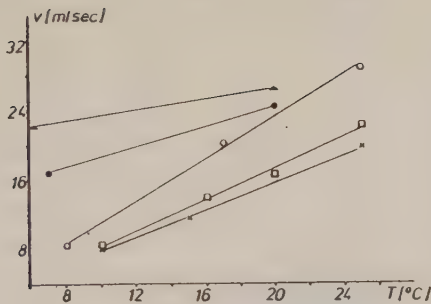


Abb. 34. Nervenleitzeit in Abhängigkeit von der Temperatur bei 5 verschiedenen Fasern, davon zwei langsam leitende und drei schnell leitende. (s.a. Abb.32.).

Die Abhängigkeit der Leitgeschwindigkeit von der Temperatur ist für jede Faser linear (Hutchinson et al. 1969),

wobei die Leitgeschwindigkeit bei schnellleitenden Fasern mit zunehmender Temperatur stärker ansteigt, als bei langsam leitenden Fasern.

Nach der in Kapitel 2.9.2. beschriebenen Methode wurde zusätzlich zur Nervenleitzeit die Transduktionszeit r des Rezeptors bestimmt.

Durch elektrische Reizung des Organs erhält man, bei Messung der Latenz von Reizbeginn bis zum Auftreten des ersten Spikes der Antwort, die Summe aus Nervenleitzeit (n) und Transduktionszeit (r) des Rezeptors.

Durch Hautableitungen (Kap. 2.9.2.) kann die Nervenleitzeit n bestimmt werden.

Wird diese nun von der oben beschriebenen Latenz ($n+r$) abgezogen, so erhält man die Transduktionszeit r des Rezeptors.

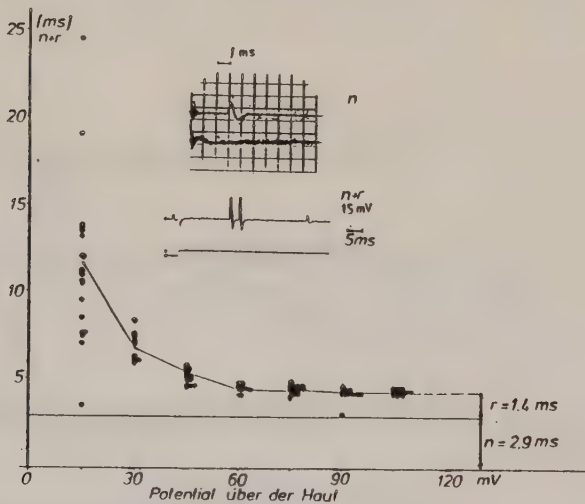


Abb. 35 a. Bestimmung der Transduktionszeit r :

Abhängigkeit der Latenz ($n+r$) von der Stärke des elektrischen Reizes.

Die Nervenleitzeit wurde in einer vorangegangenen Messung bestimmt (siehe Inset: Originalaufzeichnungen)

n = Nervenleitzeit

r = Transduktionszeit des Rezeptore ($n+r-n$)

(Inset : Originalaufzeichnung bei einem Reiz von 15 mV).

Anzahl der Messungen n	elektri- scher Reiz mV	Mittel- wert $\bar{x}$ (ms)	Standard- abweichung $x \cdot \sigma^{n-1}$ (ms)
18	15	11,21	4,78
10	30	5,9	1,82
12	45	5,09	0,45
9	60	4,5	0,22
13	75	4,4	0,24
10	90	4,3	0,19
11	105	4,3	0,2

Abb. 35 b. Standardabweichungen der Latenzen ($n+r$) aus
Abbildung 35 a .

Die Streuung nimmt mit zunehmender Reizstärke ab.

Ab einer Polarisationshöhe von 60 mV geht die Kurve in
eine Sättigung über.

r beträgt somit 1,4 ms.

In einem zweiten Experiment konnte ebenfalls ein r von
1,4 ms berechnet werden.

Siehe Abbildungen 36 a und 36 b.

In einem dritten Experiment wurde ein r von 1,7 ms er-
rechnet.

Siehe Abbildungen 37 a und 37 b .

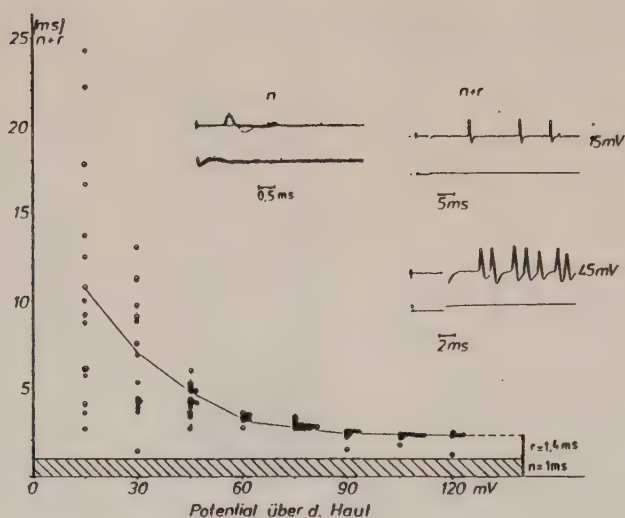


Abb. 36 a. Bestimmung der Transduktionszeit r.

n = Nervenleitzeit,

r = Transduktionszeit

(Inset : Originalaufzeichnung)

Anzahl der Messungen n	elektrischer Reiz mV	Mittelwert $\bar{x}$ (ms)	Standardabweichung $x \cdot 10^{n-1}$ (ms)
16	15	10,78	6,85
15	30	6,99	3,43
14	45	4,35	0,86
11	60	3,33	0,25
15	75	2,91	0,22
7	90	2,49	0,13
10	105	2,47	0,08
5	120	2,42	0,04

Abb. 36 b. Standardabweichung der Meßpunkte von Abb.36.a.

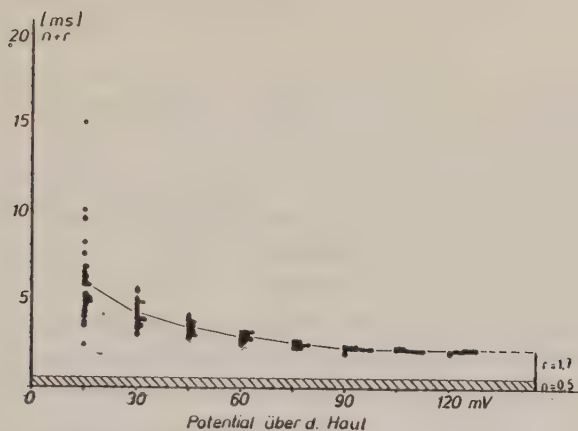


Abb. 37 a. Bestimmung der Transduktionszeit r
wie in den vorangegangenen Abb.35., 36.,
 n = Nervenleitzeit
 r = Transduktionszeit

Anzahl der Messungen n	elektrischer Reiz mV	Mittelwert $\bar{x}$ (ms)	Standardabweichung $x \cdot \sigma^{n-1}$ (ms)
29	15	5,95	2,42
19	30	4,28	0,74
14	45	3,46	0,40
14	60	2,94	0,28
11	75	2,53	0,20
13	90	2,4	0,13
13	105	2,27	0,09
15	120	2,22	0,08

Abb. 37 b. Standardabweichung der Meßpunkte aus Abb.37.a.

Die Streuung der in den Abbildungen 35 - 37 eingetragenen Latenzzeiten ($n+r$) nehmen mit der Zunahme der Reizstärke ab.

Die starke Streuung bei sehr niedrigen Reizstärken (1,5 mV) ist zum Teil auf die Tatsache zurückzuführen, daß sich diese Reize entlang der Reizschwelle bewegen und somit nicht immer eine Antwort auslösen.

Die gemessene Latenzzeit bis zum ersten Impuls nach Reizbeginn könnte die Latenz bis zum ersten Spike der Antwort sein, oder bis zum ersten spontanen Spike.

Zwischen 60 und 90 mV elektrischer Reizung bewegen sich die Kurven auf eine Sättigung zu.

Das aus diesen Sättigungswerten berechnete r ist die kürzeste Transduktionszeit, d.h. sie kann durch verstärkte Reizung nicht mehr verkürzt werden.

Jede der drei Messungen aus den Abbildungen 35 - 37 wurde an einem anderen Rezeptor durchgeführt, weshalb sich die Nervenleitzeiten in den drei Experimenten unterscheiden (anderer Abstand Organ : Ableitstelle).

3.6. Die Wirkung verschiedener Ionen auf die Mechano- und Elektrosensitivität der Rezeptoren

In allen nun folgenden Ionen-Experimenten wurde die gleiche Reihenfolge der Einzelmessungen einer Experimentalreihe beibehalten.

Dabei wurde bei jeder applizierten Ionenlösung die mechanische Reizkurve aufgestellt.

Nach Austausch der Lösung in der Präparierwanne (oder im aufgesetzten Glasrohr, siehe Kapitel 2.4.1.2. und Kapitel 3.6.3.4.) wurde das Experiment in der gleichen Reihenfolge wiederholt.

Zwischen den einzelnen Ionenlösungen wurde der Fisch mit der Standardlösung gewaschen.

3.6.1. K^+ und Na^+

Der Einfluß von K^+ und Na^+ auf die Empfindlichkeit der Rezeptoren wurde getestet.

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, konnte K^+ als Stromträger durch die Haarzelle im Innenohr klassifiziert werden.

Aus diesem Grund wurden hohe K^+ -Konzentrationen appliziert, da diese zu einer erhöhten Sensibilität führen sollten.

TEA, ein spezifischer K^+ -Kanalblocker, sollte die Sensibilität vermindern oder blockieren.

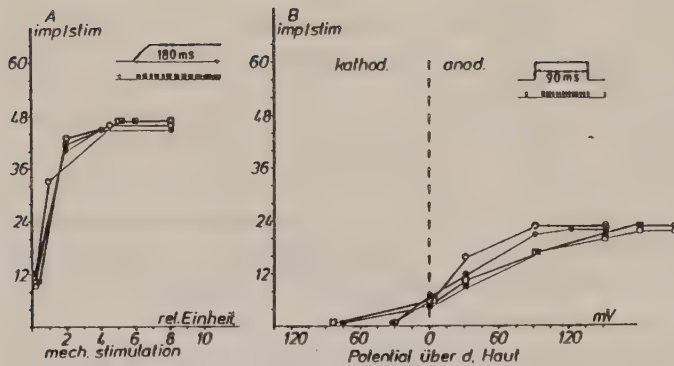


Abb. 38 a. Freier Neuromast : Beide Fasern wurden ausgezählt.

- A. Impulszahl in Abhängigkeit von der mechanischen Reizung
- B. Spontanaktivität bei elektrischer Reizung

- CaCl_2 2 mM
- CaCl_2 2 mM + KCl 100 mM
- CaCl_2 2 mM + NaCl 100 mM
- CaCl_2 2 mM + TEA 1 mM

(Einzelbeispiel aus 2 Messungen)

Anzahl der Messungen n = 2 Standardlösung : 2 mM CaCl ₂				
Ionenlösungen und Konzentrationen	Empfindlichkeitsänderung gegenüber Standard in % Mittelwerte aus allen Versuchen $\bar{x}$		Standardabweichung $\sigma \cdot 10^{-1}$	
	mech.	el.	mech.	el.
2 mM CaCl + 100 mM KCl	-0,95	-2,18	7,49	3,08
2 mM CaCl + 100 mM NaCl	-5,64	-4,35	3,56	6,14
2 mM CaCl + 1 mM TEA	+2,18	-2,18	3,08	3,08

Abb. 38 b. Mittelwerte und Standardabweichung
Prozentuale Veränderung der Empfindlichkeit
durch Applikation von NaCl, KCl und TEA
(Mittelwerte aus 3 Versuchsreihen)
Empfindlichkeit unter 2 mM CaCl₂ = 100%

Die Abbildungen 38 a und 38 b zeigen, daß K⁺ und Na⁺ keinen Einfluß auf die Mechanosensitivität oder Elektrosensitivität haben, da weder hohe Ionenkonzentrationen noch TEA die Empfindlichkeit verändern.

Um die Möglichkeit einer Diffusion von K⁺-Ionen aus dem Schleim oder der Fischhaut auszuschließen, wurde das Organ nach jeder Applikation mehrfach mit der Standardlösung (2 mM CaCl₂) gespült (s.a. Kap. 3.1.3.).

Die flacheren Steigungen unter 100 mM KCl und 100 mM NaCl in den Abbildungen 38 a und b sind auf die größere Leitfähigkeit dieser Lösungen zurückzuführen (Kap. 2.8.1., Vorversuche Kap. 3.1.1.).

3.6.2. Ca²⁺

Da aus dem Fisch, wie in den Vorversuchen, Kapitel 3.1.3. beschrieben wurde, 1,6 mM Ca²⁺ innerhalb einer Stunde diffundieren, mußte mit EDTA gearbeitet werden, um Ca²⁺-arme Lösungen herzustellen.

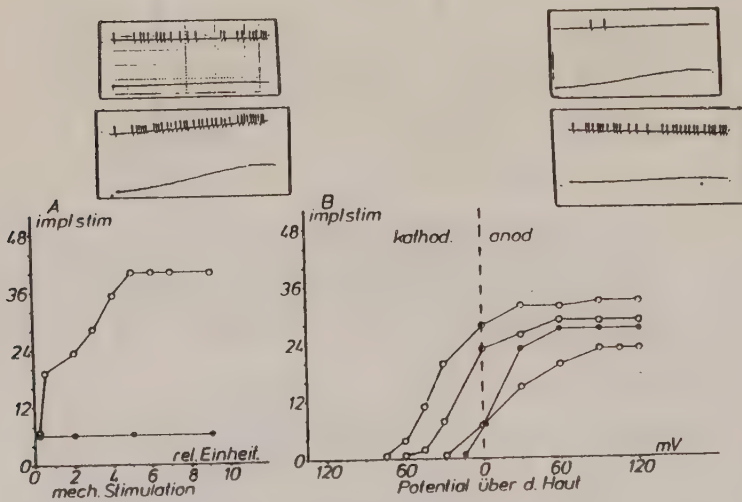


Abb. 39 a. Freier Neuromast: Einzelfaser
Die Wirkung von EDTA

A: mechanische Reizung

Insets: oben: 2 mM NaCl, 0,5 rel. E.
unten: 2 mM NaCl, 4 rel. E.

B: mittlerer mech. Reiz und zusätzliche Vorpolarisation

Insets: oben: 2 mM NaCl, kath. 45 mV
unten: 2 mM NaCl anod. 60 mV

-○- 2 mM NaCl

-●- 2 mM NaCl + 0,2 mM EDTA

Anzahl der Messungen n = 5				
Standardlösung : 2 mM NaCl				
Ionenlösungen und Konzentrationen	Empfindlichkeitsänderung gegenüber Standard in % Mittelwerte aus allen Versuchen $\bar{x}$		Standardabweichung $\sigma \cdot 10^{n-1}$	
	mech.	el.	mech.	el.
2 mM NaCl + 200 μ M EDTA	-92,63	+ 3,2	6,79	20,39

Abb. 39 b. Mittelwerte und Standardabweichung aus 5 verschiedenen Messungen zu Abb. 39 a.

Prozentuale Empfindlichkeitsänderung

Empfindlichkeit unter 2 mM NaCl = 100%

mech. Reiz : Anzahl der Impulse in der Sättigung

el. Reiz : Änderung der Impulszahl bei einem mittleren mechanischen Reiz durch zusätzliche Vorpolarisation bis zur Sättigung.

Die Abbildungen 39 a und 39 b demonstrieren, daß 0,2 mM EDTA zu vollständigem Empfindlichkeitsverlust des Rezeptors gegenüber mechanischer Reizung führt, während die Sensibilität gegenüber elektrischer DC-Stimulation noch vollständig erhalten ist.

Um den Einfluß von Ca^{2+} -Mangel auf die elektrische Sensibilität zu testen, wurden in späteren Versuchen EDTA-Lösungen höherer Konzentrationen appliziert.

Die hohe Standardabweichung für die elektrische Reizung, im Gegensatz zur niedrigen Standardabweichung für die mechanische Reizung, aus der Tabelle in Abbildung 39 b, demonstriert, daß hier stärkere Schwankungen innerhalb der einzelnen Versuche stattfinden, obwohl sich die elektrische Empfindlichkeit unter $200 \mu\text{M}$ EDTA im Mittel nur um 3,2 % ändert.

Diese Schwankungen zeigen, daß eine solche mittlere EDTA-Konzentration die mechanische Sensitivität zwar in allen Fällen vollständig unterdrückt, die elektrische Empfindlichkeit jedoch wird bei manchen Organen noch nicht unterdrückt, bei anderen Organen aber schon leicht erniedrigt.

Erhalten bleibt die wichtige Aussage, daß ein Rezeptor, welcher in seiner Mechanosensitivität schon vollständig durch eine mittlere EDTA-Konzentration blockiert ist, auf elektrische Reizung noch immer mit Impulszahlerrhöhung antwortet.

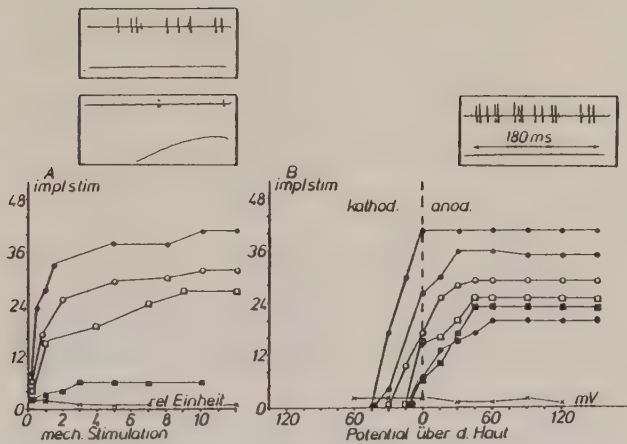


Abb. 40 a. Freier Neuromast : Einzelfaserauswertung
 Insets : 3 Originalaufzeichnungen

A: Empfindlichkeit gegenüber mechanischer
 Reizung bei:

● NaCl 2 mM + CaCl₂ 10 mM (Inset oben:
 spontan)

○ NaCl 2 mM

□ NaCl 2 mM + EDTA 0,04 mM

■ NaCl 2 mM + EDTA 0,2 mM

✕ NaCl 2 mM + EDTA 1 mM (Inset oben:
 10 rel. E.)

B: Empfindlichkeit gegenüber DC-Polarisation

NaCl 2 mM + CaCl₂ 10 mM

3 verschiedene mechanische Reize werden
 durch Vorpolarisation variiert

Inset : kleiner mechanischer Reiz + anodi-
 sche Vorpolarisation 30 mV

Anzahl der Messungen n = 3 Standardlösung : 2 mM NaCl				
Ionenlösungen und Konzentrationen	Empfindlichkeitsänderung gegenüber Standard in % Mittelwerte aus allen Versuchen $\bar{x}$		Standardabweichung σ_{n-1}	
	mech.	el.	mech.	el.
2 mM NaCl + 10 mM CaCl ₂	+19,24	+13,25	12,5	15,3
2 mM NaCl + 40 µM EDTA	-17,14	- 4,5	1,03	4,21
2 mM NaCl + 1 mM EDTA	-91,11	- 100	3,95	0,0

Abb. 40 b. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Versuchsreihen zur Abb. 40 a.

2 mM NaCl = 100%

prozentuale Empfindlichkeitsänderung

Mit zunehmender EDTA-Konzentration im Außenmedium wird die Mechano-Sensibilität geringer.

Erst bei sehr hoher EDTA-Konzentration wird das Organ auch unempfindlich gegenüber elektrischer Reizung (EDTA 1 mM).

Somit ist die Empfindlichkeit gegenüber mechanischer sowie elektrischer Stimulation von der Ca^{2+} -Konzentration im Außenmedium abhängig, wobei die Mechano-Sensibilität durch geringere Konzentrationen unterdrückt werden kann als die Elektrosensibilität.

Drei verschiedene mechanische Reizantworten in einer Lösung von 2 mM NaCl und 10 mM CaCl_2 wurden in dem Experiment elektrisch moduliert.

Dabei ist, wie bereits in Kapitel 3.4.1. erwähnt, die Antwort auf einen hohen mechanischen Reiz, welche sich bereits in der Sättigung befindet, durch anodische Polarisation nicht mehr erhöhbar, während jeder mittlere mechanische Reiz sein eigenes elektrisches Sättigungsplateau hat.

Die Tabelle 40 b gibt die Mittelwerte aus 3 Versuchen an, wobei ersichtlich ist, daß 40 μM EDTA die mechanische Empfindlichkeit etwas herabsetzt (ca. 20%), während die elektrische Empfindlichkeit noch voll erhalten ist.

Erst 1 mM EDTA führt zu vollständiger Blockade des Rezeptors für beide Reizformen.

Diese unterschiedliche Hemmbarkeit der Rezeptoren für elektrische und mechanische Reizung wird auch in folgendem Experiment deutlich, welches den Zeitverlauf der Blockade sowie ihrer Reversibilität aufzeigt.

Dafür wurden Zeitfenster von 200 ms ausgezählt. Zuerst wurden die innerhalb dieses Fensters ohne Reizung auftretenden spontanen Impulse ermittelt, anschließend das Organ mechanisch gereizt - in einer Stärke, welche eine Antwort in der Sättigung hervorruft - und die Impulszahl, welche auf diesen Reiz folgt, in dem gleichen Zeitfenster von 200 ms ausgezählt. Dem mechanischen Reiz folgte ein elektrischer Reiz von 200 ms Dauer,

dessen Antwort ebenso in beschriebenem Zeitfenster ermittelt wurde. Auch für diese Stimulation wurde eine Reizstärke gewählt, welche eine Antwort in der Sättigung hervorruft. Die auftretende Impulszahl in besagtem Zeitfenster wird in folgender Abbildung im Vergleich dargestellt.

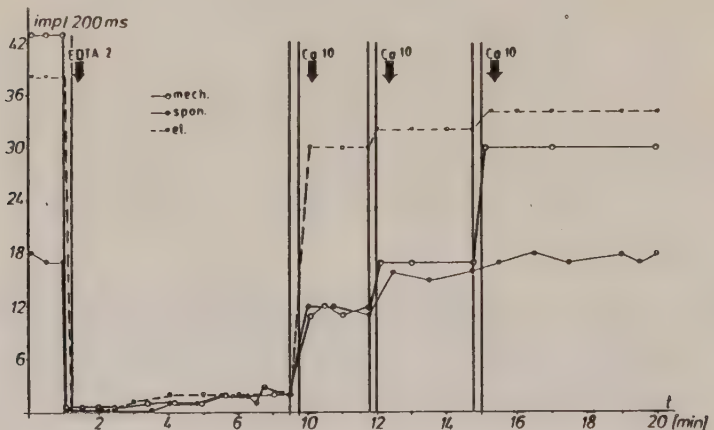


Abb. 41 a. Freier Neuromast : beide Fasern wurden ausgezählt

Reversibilität der Empfindlichkeit auf mechanische und elektrische Reizung nach Applikation von 2 mM EDTA.

Die EDTA-Lösung wurde durch 10 mM CaCl_2 ersetzt.

Es wurde die Impulszahl in einem Zeitfenster von 200 ms ausgezählt.

mechanischer Reiz : Sinusreiz

elektrischer Reiz : Rechteckreiz (Variation der Spontanaktivität)

Säulen : Lösungstausch

(Einzelbeispiel aus 2 Messungen).

Anzahl der Messungen n = 2 Standardlösung : 2 mM CaCl ₂				
Ionenlösungen und Konzentrationen	Empfindlichkeitsänderung gegenüber Standard in % Mittelwerte aus allen Versuchen $\bar{x}$		Standardabweichung $\sigma \cdot 10^{-1}$	
	mech.	el.	mech.	el.
10 mM CaCl ₂ 1 x spülen	-77,57	-30,87	7,75	0,9
10 mM CaCl ₂ 2 x spülen	-63,17	-26,34	6,5	1,07
10 mM CaCl ₂ 3 x spülen	-31,23	-21,42	1,39	0,69
2 mM EDTA	-92,81	-93,72	2,98	1,29

Abb. 41 b. Mittelwerte und Standardabweichung aus zwei Messungen
2 mM CaCl₂ : 100%
prozentuale Rückkehr der Empfindlichkeit nach vollständigem Empfindlichkeitsverlust unter 2 mM EDTA durch Spülen mit 10 mM CaCl₂.

Abbildung 41 zeigt, daß die durch EDTA (Ca²⁺-Mangel) blockierte Empfindlichkeit durch Ca²⁺-Zugabe (mehrfaches Spülen) wieder zurückkehrt.

Es ist ersichtlich, daß die Empfindlichkeit gegenüber elektrischer Stimulation schnell reversibel ist, (nach 1x spülen nur noch 30% Abnahme, s. Abb.41 b.), während die mechanische Sensibilität langsamer zurückkehrt (3x spülen, 31,2% Abnahme).

Bei einer bestimmten mittleren Ca²⁺-Konzentration ist also die mechanische Empfindlichkeit blockiert, während das Organ elektrisch noch voll sensibel ist (s.a. Abb.39 a,b.).

3.6.3. Ca^{2+} -Antagonisten.

kompetitive Hemmung und Reversibilität

In den folgenden Experimenten wird die geänderte Empfindlichkeit gegenüber mechanischer und elektrischer Reizung unter dem Einfluß verschiedener Ca^{2+} -Antagonisten geprüft.

Die wirksamen Konzentrationen der verschiedenen Ionen wurden durch Vorversuche ermittelt.

3.6.3.1. La^{3+}

Es wurde der Einfluß von La^{3+} auf die Sensibilität von Kanalorganen (Abb. 42 a., Abb. 42 b.) und freien Neuromasten (Abb. 43 a., Abb. 43 b.) untersucht.

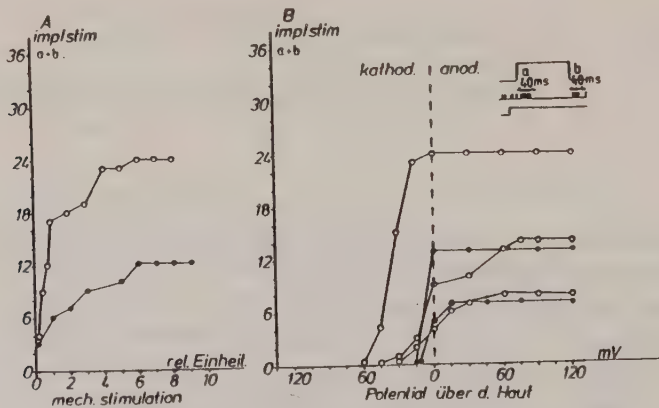


Abb. 42 a. Kanalorgan : Einzelfaser

Der Einfluß von LaCl_3 (6 mM) auf die Empfindlichkeit der Kanalorgane

A : Impulszahl bei steigendem mechanischem Reiz

B : Impulszahl bei mittlerer mechanischer

Reizung und zusätzlicher DC-Polarisation

Inset : mechanischer Reiz : Erschütterungsreiz

a + b : ausgezähltes Zeitfenster

Anzahl der Messungen $n = 6$ Standardlösung : Leitungswasser				
Ionenlösungen und Konzentrationen	Empfindlich- keitsänderung gegenüber Standard in %		Standard- abweichung	
	Mittelwerte aus allen Versuchen $\bar{x}$		$\sigma \cdot 10^{-1}$	
6 m. LaCl_3	mech.	el.	mech.	el.
	-50,5	-2,6	9,1	34,1

Abb. 42 b. Mittelwerte und Standardabweichung aus 6 Messungen zu Abb. 42.a.

Empfindlichkeit in Leitungswasser = 100%

Prozentuale Empfindlichkeitsänderung unter LaCl_3 .

Aus den vorangegangenen Abbildungen geht hervor, daß La^{3+} bei einer mittleren Konzentration die mechanische Empfindlichkeit um die Hälfte erniedrigt (s. Abb.42 b.: -50,5%), während die elektrische Empfindlichkeit erhalten bleibt (- 2,6%).

Dabei wirkt La^{3+} wie ein niedriger mechanischer Reiz oder wie Ca^{2+} -Mangel (s. Abb.39., Abb.40.).

Ebenso kann die Antwort auf hohe mechanische Reizung (Sättigung) auch unter La^{3+} -Einfluß durch anodische Vorpolarisation nicht mehr erhöht werden (s.a. Abb.27 b.).

Daß die blockierende Wirkung des La^{3+} mit einer kompetitiven Hemmung der Ca^{2+} -Wirkung einhergeht, zeigt die folgende Graphik (Abb.43a.).

Die La^{3+} -Wirkung kann durch Ca^{2+} -Zugabe kompensiert werden.

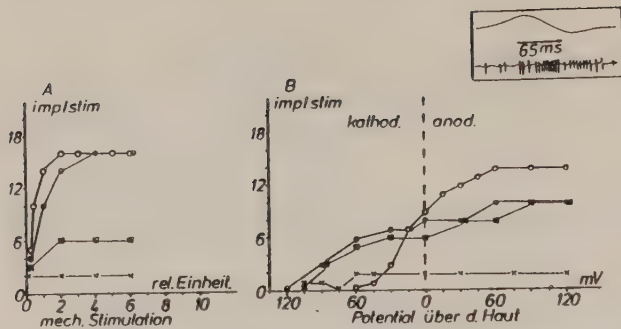


Abb. 43 a. freier Neuromast : Einzelfaser

Die Hemmung durch La^{3+} in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration

A : Impulsantwort bei steigendem mechanischen Reiz

B : mechanischer Reiz, elektrisch moduliert

Versuchsreihenfolge:

○ 2 mM CaCl_2

● 50 mM CaCl_2 + 0,1 mM LaCl_3

x 2 mM CaCl_2 + 0,1 mM LaCl_3

■ 50 mM CaCl_2 + 0,1 mM LaCl_3

Inset: Originalaufzeichnung (2 mM CaCl_2 ,
anodische Vorpolarisation : 120 mV)
ausgezähltes Zeitfenster 65 ms

Anzahl der Messungen n = 3(I), 6(II, III), 2(IV) Standardlösung : 2 mM CaCl ₂				
Ionenlösungen und Konzentrationen	Empfindlich- keitsänderung gegenüber Standard in % Mittelwerte aus allen Versuchen $\bar{x}$		Standard- abweichung $\sigma \cdot n^{-1}$	
	mech.	el.	mech.	el.
(I) 50 mM CaCl ₂ + 0,1 mM LaCl ₃	-4,0	-11,76	3,61	12,58
(II) 2 mM CaCl ₂ + 0,1 mM LaCl ₃	-47,6	-27,0	20,5	3,46
(III) 2 mM CaCl ₂ + 3 mM LaCl ₃	-86,57	-84,0	0,75	3,61
(IV) 50 mM CaCl ₂ + 0,1 mM LaCl ₃ (Reversibilität nach vollständigem Empfind- lichkeitsverlust: 80%)	-62,8	-18,34	10,2	2,35

Abb. 43 b. Mittelwerte und Standardabweichungen aus weiteren Meßreihen zu Abb. 43.a.
Prozentuale Empfindlichkeitsänderungen
2 mM CaCl₂ = 100%.

Nach den beschriebenen Ergebnissen führt 2 mM CaCl₂ + 0,1 mM LaCl₃ bei den freien Neuromasten zu vollständigem Sensibilitätsverlust gegenüber jeder der verwendeten Reizformen, während die Empfindlichkeit der Kanalorgane unter dem Einfluß von 6 mM LaCl₃ erst zur Hälfte reduziert werden kann.

Der Einfluß des LaCl₃ ist bei den freien Neuromasten also 500 mal effektiver als bei den Kanalorganen. Da jedoch die blockierende Wirkung auf die Kanalorgane auch in sehr kurzer Zeit (1 Minute) eintritt, kann die größere Unempfindlichkeit nicht mit Diffusionsproble-

men erklärt werden.

In beiden beschriebenen Systemen führen hohe Konzentrationen von La^{3+} zu vollständigem Sensibilitätsverlust, wobei jedoch eine gewisse, obwohl stark reduzierte, Spontanaktivität erhalten bleibt (s. Tabelle Abb.43 b., bei 3 mM LaCl_3 , Empfindlichkeit bleibt 4-6%).

Die Reversibilität nach La^{3+} -Einwirkung ist mäßig und hängt von der vorher applizierten Konzentration ab. So ist die Blockade der freien Neuromasten durch eine 3 mM LaCl_3 -Lösung auch durch sehr hohe Ca^{2+} -Konzentrationen (200 mM) nicht mehr reversibel.

Nach geringeren Konzentrationen (0,1 mM LaCl_3) kann eine teilweise Rückkehr der Empfindlichkeit durch hohe Ca^{2+} -Zugaben erzielt werden.

Dieser Reversibilitätserfolg unterliegt jedoch von Organ zu Organ sehr großen Schwankungen.

Ebenso ist die Reaktion der einzelnen Organe auf bestimmte La^{3+} -Konzentrationen sehr unterschiedlich.

Eine Lösung von 2 mM CaCl_2 + 0,1 mM LaCl_3 führt bei manchen Organen zu völligem Verlust der Empfindlichkeit (s. Abb.43 a.), während diese Konzentration die Empfindlichkeit bei anderen Organen nur um die Hälfte reduziert.

Dies wird durch die hohe Standardabweichung der Tabelle in Abb.34 b. II deutlich.

Die flacheren Steigungen der Kurven aus den Abbildungen 43a und 44a sind auf die große Leitfähigkeit der hochmolaren Lösungen zurückzuführen (s. Kap. 3.1.1.).

3.6.3.2. Co^{2+}

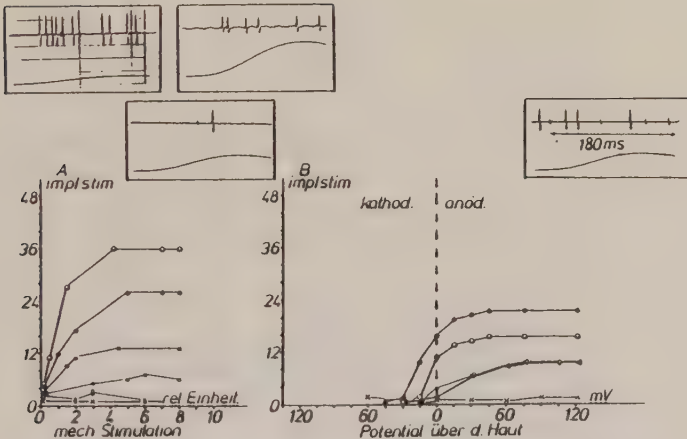


Abb. 44 a. Freier Neuromast : Einzelfaser

Die Empfindlichkeit der freien Neuromasten gegenüber der Co^{2+} -Konzentration.

A : Impulszahl als Antwort auf mechanische Reizung.

Insets : oben links: 20 mM CoCl_2 , 1,5 rel.E.
oben rechts: 30 mM CoCl_2 , 5,0 rel.E.
unten : 60 mM CoCl_2 , 2,0 rel.E.

B : Impulszahl als Antwort auf elektrisch modulierte mittlere mechanische Reizung.

Inset : 60 mM CoCl_2 , anod.Vorpol. 180 mV

Versuchsreihenfolge:

- o 2 mM CaCl_2
- 2 mM CaCl_2 + 10 mM CoCl_2
- ◻ 2 mM CaCl_2 + 20 mM CoCl_2
- 2 mM CaCl_2 + 30 mM CoCl_2
- ◐ 2 mM CaCl_2 + 40 mM CoCl_2
- x 2 mM CaCl_2 + 60 mM CoCl_2

Zeitfenster : 180 ms.

Anzahl der Messungen n = 2 Standardlösung : 2 mM CaCl ₂				
Ionenlösungen und Konzentrationen	Empfindlich- keitsänderung gegenüber Standard in % Mittelwerte aus allen Versuchen $\bar{x}$		Standard- abweichung $\sigma \cdot 10^{-1}$	
	mech.	el.	mech.	el.
2 mM CaCl ₂ + 10 mM (6 mM) CoCl ₂	-20,2		9,6	
2 mM CaCl ₂ + 30 mM CoCl ₂	-66,4	-8,3	19,94	11,81
2 mM CaCl ₂ nach 30 mM CoCl ₂	-39,1		1,48	
2 mM CaCl ₂ + 60 mM CoCl ₂	-94,3	-100	0,2	0,0

Abb. 44 b. Mittelwerte und Standardabweichungen aus weiteren Meßreihen zu Abb. 44.a. und 45.
Prozentuale Empfindlichkeitsänderung
2 mM CaCl₂ = 100%

Wie in vorangegangenen Experimenten zeigen diese Kurven die gleichen Effekte des blockierenden Ions: Die Mechanosensibilität wird herabgesetzt, während die elektrischen Reizkurven denjenigen ähneln, die bei einem geringeren mechanischen Reiz auftreten. Dieser blockierende Effekt ist in seiner Stärke vom Verhältnis Ca^{2+} /Inhibitor abhängig, wobei seine Reversibilität von der Konzentration der vorher applizierten Co^{2+} -Lösung beeinflusst wird. Dies wird in folgenden beiden Graphiken deutlich:

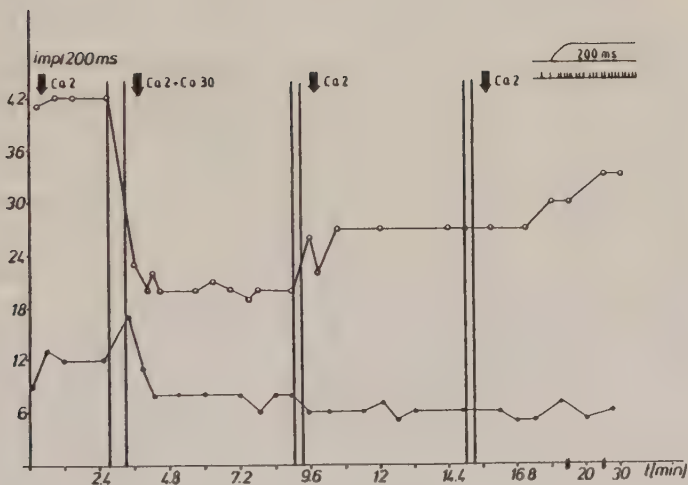


Abb. 45. Freier Neuromast; Zwei Fasern

Reversibilität der Empfindlichkeit nach einer 30 mM CoCl_2 -Lösung.
 Es wurde dreimal mit CaCl_2 gespült.
 Die Säulen zeigen den Lösungswechsel an.
 Zeitfenster: 200 ms
 -○- mechanischer Reiz
 -●- Spontanaktivität
 (zur Reversibilität s.a. Abb.46.)

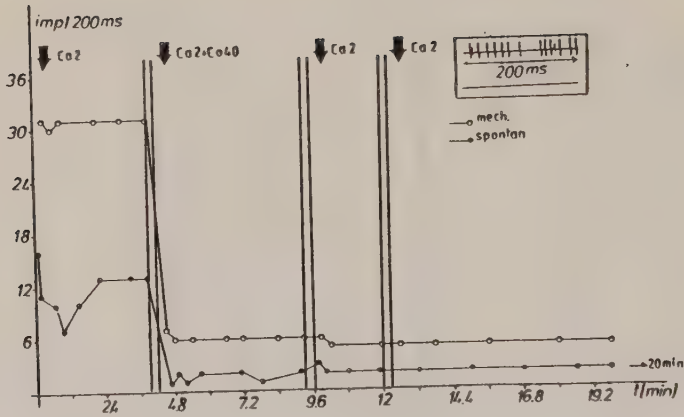


Abb. 46. Freier Neuromast: Einzelfaser

Reversibilität der Empfindlichkeit nach einer 40 mM CoCl_2 -Lösung.
Es wurde dreimal mit CaCl_2 (2 mM) gespült.
Die Säulen zeigen den Lösungswechsel an.

-○- mechanischer Reiz

-●- Spontanaktivität

Einzelbeispiel aus zwei Messungen

Inset: 2 mM CaCl_2 , spontan
(Originalaufzeichnung)

Nach den Ergebnissen der Abbildungen 45 und 46 ist sichergestellt, daß die Reversibilität von der Konzentration der vorher applizierten Ionenlösung abhängt.

Ein $\text{Ca}^{2+}/\text{Co}^{2+}$ -Verhältnis, bei welchem noch eine bestimmte geringe mechanische Sensibilität erhalten bleibt (z.B. 2 mM CaCl_2 + 30 mM CoCl_2), führt zu einer schwächeren Blockade des Rezeptors, welche durch Spülen mit CaCl_2 relativ leicht wieder aufgehoben werden kann, während eine Inhibitor-Konzentration, welche die Empfindlichkeit des Rezeptors vollständig unterdrückt (2 mM CaCl_2 + 40 mM CoCl_2), das Organ irreversibel blockiert.

Möglicherweise kann auch eine solch starke Blockade durch noch höhere Ca^{2+} -Zufuhr wieder aufgehoben werden - dies wurde jedoch nicht untersucht.

3.6.3.3. Mg^{2+}

Gegenüber Mg^{2+} zeigten sich die Organe relativ unempfindlich.

Die in vorangegangenen Experimenten benutzte 2 mM CaCl_2 /Inhibitor-Lösung konnte hier nicht mehr verwendet werden, da eine Zugabe von nur 2 mM CaCl_2 genügte, um die Wirkung von 60 mM MgCl_2 zu unterdrücken.

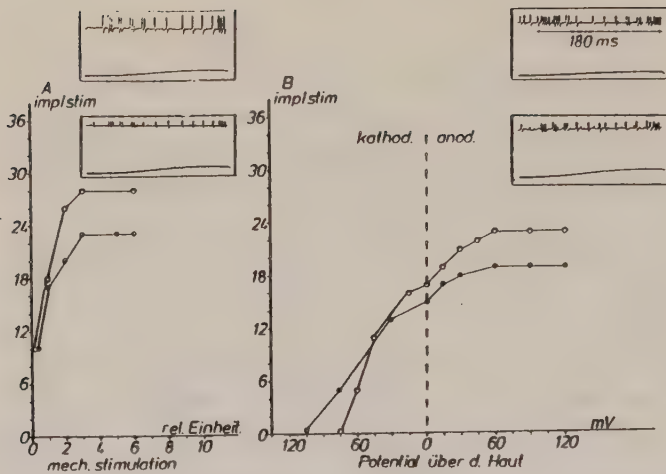


Abb. 47. Freier Neuromast: Einzelfaser

Der Einfluß einer 2 mM CaCl₂ + 60 mM MgCl₂ - Lösung auf die Empfindlichkeit.

A: Impulsantwort auf steigenden mechanischen Reiz.

Insets: oben: 2 mM CaCl₂, 1 rel. E.
 unten: 2 mM CaCl₂ + 60 mM MgCl₂, 1 rel. E.

B: Mittlerer mechanischer Reiz, durch DC-Polarisation moduliert.

Insets: oben: 2 mM CaCl₂, anod. 120 mV
 unten: 2 mM CaCl₂ + 60 mM MgCl₂, anod. 120 mV

Zeitfenster: 180 ms

-○ 2 mM CaCl₂

-● 2 mM CaCl₂ + 60 mM MgCl₂

Wegen der Unempfindlichkeit der Organe gegenüber Mg^{2+} wurden in dem folgenden Experiment Ca^{2+} -freie Lösungen verwendet. Da, wie in Kap. 3.1.3. beschrieben, Ca^{2+} aus dem Fisch diffundiert, ist seine Konzentration in der umgebenden Lösung groß genug, um eine normale Rezeptorfunktion zu gewährleisten.

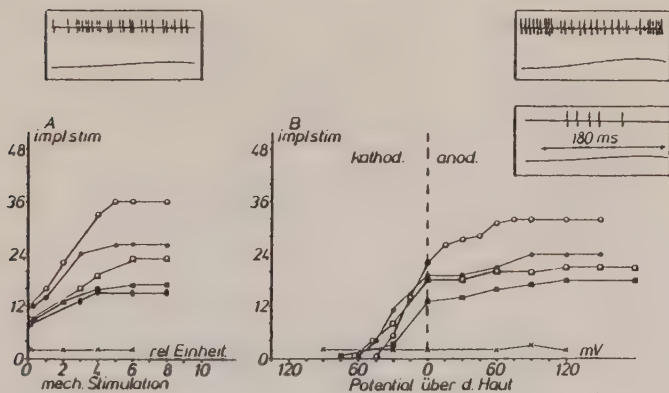


Abb. 48 a. Freier Neuromast: Einzelfaser

A: Impulsantwort auf steigenden mechanischen Reiz.

Inset: 2 mM NaCl, 2 rel. E.

B: Impulsantwort auf elektrisch modulierten mittleren mechanischen Reiz

Insets: oben: 2 mM NaCl, anod. 150 mV
unten: 2 mM NaCl, kath. 30 mV

-○ 2 mM NaCl (Standard)

-● 2 mM NaCl + 10 mM $MgCl_2$

-◐ 2 mM NaCl + 20 mM $MgCl_2$

-■ 2 mM NaCl + 30 mM $MgCl_2$

-◑ 2 mM NaCl + 40 mM $MgCl_2$

-x 2 mM NaCl + 60 mM $MgCl_2$

Anzahl der Messungen $n = 2$ Standardlösung : 2 mM CaCl_2 2 mM NaCl				
Ionenlösungen und Konzentrationen	Empfindlichkeitsänderung gegenüber Standard in % Mittelwerte aus allen Versuchen $\bar{x}$		Standardabweichung $\sigma \cdot 10^{n-1}$	
	mech.	el.	mech.	el.
2 mM CaCl_2 + 60 mM HgCl_2	-13,35	-31,65	6,29	2,33
2 mM NaCl + 20 mM HgCl_2	-50,4	-55,0	16,4	7,07
2 mM NaCl + 60 mM HgCl_2	-94,45	-100	0,07	0,0

Abb. 48 b. Mittelwerte und Standardabweichungen zu weiteren Versuchen der Abb. 48.a.
Prozentuale Empfindlichkeitsänderung.
2 mM $\text{NaCl} = 100\%$

Die Ergebnisse der vorangegangenen beiden Abbildungen entsprechen denen in bereits beschriebenen Ionenexperimenten, wobei allerdings starke Unterschiede in der Effektivität der verwendeten Ionen auffällig sind.

Die Effektivität des Magnesiums ist um ein vielfaches geringer als die des Lanthans und des Cobalts. Dies spiegelt sich auch in folgendem Reversibilitätsexperiment wider. Wie in Abb. 43 und 44 fällt auf, daß auch bei vollständigem Empfindlichkeitsverlust eine geringe Spontanaktivität erhalten bleibt.

Wie bereits erwähnt, besteht ein direkter Zusammenhang der Hemmungseffektivität verschiedener Ionen mit der Reversibilität ihrer Wirkung, wobei der blockierende Effekt von Co^{2+} und La^{2+} relativ schwer reversibel ist, während, wie folgende Graphik beweist, die Inhibition durch 60 mM MgCl_2 mit einer 2 mM CaCl_2 -Lösung problemlos wieder aufgehoben werden kann.

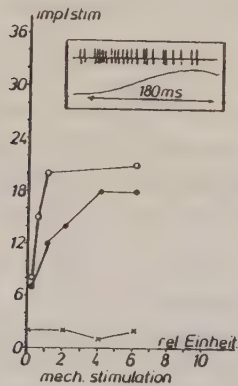


Abb. 50. Freier Neuromast: Einzelfaser

Die Reversibilität der Mg^{2+} -Wirkung.

Inset: 2 mM NaCl + 2 mM CaCl_2 , 6 rel. E.

Versuchsreihenfolge:

-O 2 mM NaCl + 2 mM CaCl_2

-x 2 mM NaCl + 60 mM MgCl_2

-● 2 mM NaCl + 2 mM CaCl_2

3.6.3.4: D 600 und A-QA 39 Cl

Bei den hier verwendeten chemischen Substanzen, D 600-Gallopamil-Hydrochlorid (Fa. Knoll AG, Ludwigshafen) und A-QA 39-Cl (Fa. Thomae GmbH, Biberach), handelt es sich in beiden Fällen um für die Coronarthherapie entwickelte Verbindungen.

Nach der Literatur (Kohlhard et al. 1972, Mayer et al. 1972, Mc Donald et al. 1980, Pelzer et al. 1982) wirken diese Stoffe in Herzmuskelzellen als Ca^{2+} -Kanalblocker.

Da von diesen Substanzen nur sehr geringe Mengen zur Verfügung standen - sie wurden dankenswerterweise von obengenannten Firmen dem Labor überlassen - mußten sie durch ein Glasrohr, welches auf das Organ aufgesetzt wurde, appliziert werden (Methodik 2.4.1.2. und Abb.5).

Die mechanischen Reize wurden als Erschütterungsreize gegen das Glasrohr angewendet.

Aus diesem Grund sind bei den folgenden Meßreihen unter mechanischer Stimulation keine eindeutigen Sättigungsplateaus erreichbar, da die Reizstärke nicht weit genug erhöht werden konnte.

Die elektrische Stimulation erfolgte in Form von Rechteckreizen, als Erhöhung oder Erniedrigung der Spontanaktivität.

Die größere Steilheit dieser elektrischen Reizkurven, im Gegensatz zu vorangegangenen Experimenten, beruht auf der Reizapplikation, die auf die kleine Fläche des mit Flüssigkeit gefüllten Glasrohres beschränkt ist (Glasrohr $\varnothing$ 0.5 cm), da sich der Rest des Fischkörpers nicht in der Lösung befindet.

Da die D 600-Verdünnungen aus einer Äthanol-Basis-Lösung hergestellt werden mußten (Kap. 2.8.5.), wurde zuerst getestet, ob die Äthanollösung allein das Organ beeinflußt. Dies konnte nicht bestätigt werden.

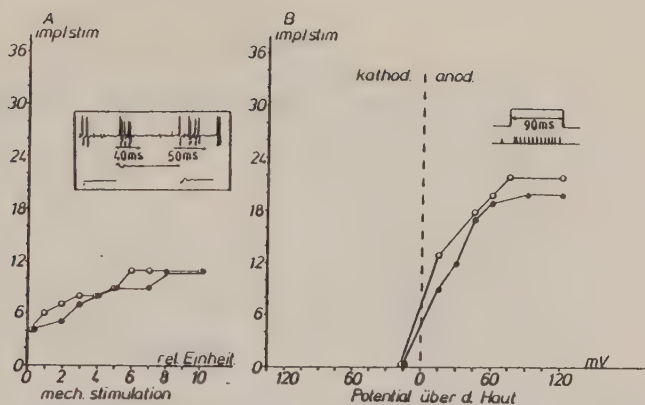


Abb. 51. Freier Neuromast: Einzelfaser

Der Einfluß einer 16 mM-Äthanollösung auf die

A: Mechanosensibilität

Inset: 2 mM CaCl_2 + 16 mM Äth., 7 rel.E.

B: Elektrosensibilität

-○- 2 mM CaCl_2

-●- 2 mM CaCl_2 + 16 mM Äthanol

Mehrmaliges Abheben und Wiederaufsetzen des Glasrohres auf das Organ führte zu keiner Änderung der Ergebnisse.

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition durch D 600.

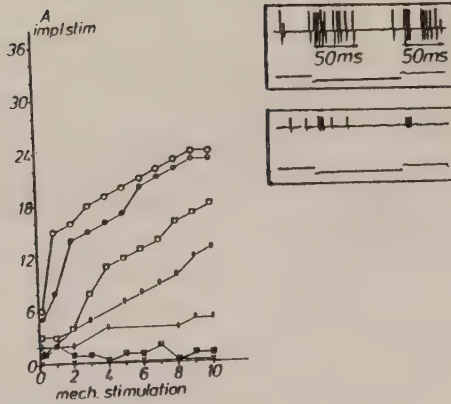


Abb. 52. Freier Neuromast: Einzelfaser
 Kompetitive Hemmung des D 600
 (Erschütterungsreiz s. Abb. 5)
 Insets: oben: 2 mM CaCl_2 , 3 rel. E.

unten: 50mM CaCl_2 + 0,2 mM D 600,
 3 rel. E.

Versuchsreihenfolge:

- O 2 mM CaCl_2
- 50mM CaCl_2
- 50mM CaCl_2 + 0,2 mM D 600
- 2 mM CaCl_2 + 0,2 mM D 600
- ◐ 50mM CaCl_2 + 0,2 mM D 600
- ◑ 50mM CaCl_2 + 1 mM D 600
- x 50mM CaCl_2 + 5 mM D 600

(Einzelbeispiel aus zwei Messungen, Statistik siehe Abb. 53.b.)

Die Stärke der hemmenden Wirkung, sowie ihre Reversibilität, ist von dem Verhältnis Ca^{2+} /Inhibitor abhängig.

Obwohl die Effektivität des D 600 sehr groß ist - sie liegt ungefähr in der gleichen Größenordnung wie bei Lanthan - ist die Reversibilität seiner Hemmung sehr gut.

Nach vollständiger Blockade der mechanischen Empfindlichkeit durch eine Lösung von 2 mM CaCl_2 + 0,2 mM D 600 kann durch einmaligen Lösungswechsel (50 mM CaCl_2 + 0,2 mM D 600) bereits wieder eine 50%-Antwort auf mechanische Reizung erzielt werden.

Auffällig ist, im Gegensatz zu früheren Experimenten mit anderen Ionen, ein vollständiger Verlust nicht nur der Empfindlichkeit, sondern auch der Spontanaktivität unter hohen Konzentrationen (s. Abb.52).

In einem weiteren Experiment wurde die Wirkung des D 600 auf die Elektrosensibilität getestet (Abb.53.).

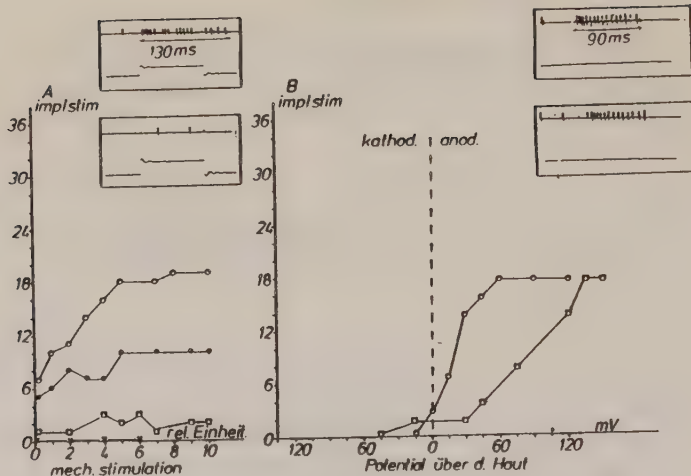


Abb.53 a. Freier Neuromast: Einzelfaser

Die Empfindlichkeit der Rezeptoren unter Einfluß von 1 mM D 600.

A: Impulsantwort bei steigendem mech. Reiz

Insets: oben: 2 mM CaCl_2 , 6 rel. E.

unten: 2 mM CaCl_2 + 1 mM D 600,

9 rel. E.

B: Impulsantwort auf elektr. Rechteckreiz.

Insets: oben: 2 mM CaCl_2 , anod. 30 mV

unten: 2 mM CaCl_2 + 1 mM D 600, anod. 120 mV

Versuchsreihenfolge:

-o 2 mM CaCl_2

-□ 2 mM CaCl_2 + 1 mM D 600

-● 2 mM CaCl_2

-x 2 mM CaCl_2 + 5 mM D 600

Anzahl der Messungen n = 5(I,III),2(II) Standardlösung : 2 mM CaCl ₂				
Ionenlösungen und Konzentrationen	Empfindlichkeitsänderung gegenüber Standard in % Mittelwerte aus allen Versuchen $\bar{x}$		Standardabweichung $\sigma \cdot 10^{n-1}$	
	mech.	el.	mech.	el.
2 mM CaCl ₂ + 0,2 mM D 600	-85,4	-4,54	4,76	8,76
50 mM CaCl ₂ + 0,2 mM D 600 (Reversib. nach I)	-59,7		1,98	
2 mM CaCl ₂ + 5 mM D 600	-100	-100	0,0	0,0

Abb. 53 b. Mittelwerte und Standardabweichungen weiterer Experimente zu den Abb. 52.a und 53.a.
Prozentuale Empfindlichkeitsänderung
2 mM CaCl₂ = 100%

Auch D 600 beeinflusst die elektrische Sensitivität der Rezeptoren in anderer Weise als die mechanische Sensitivität. Obige Abbildung zeigt, daß eine mittlere Konzentration des Inhibitors die Empfindlichkeit gegenüber mechanischer Reizung bereits vollständig unterdrückt, während die Empfindlichkeit gegenüber elektrischer Rechteckreizung noch vollständig erhalten ist.

In den nun folgenden beiden Abbildungen werden die Ergebnisse, welche zur Wirkung von D 600 gewonnen werden konnten, für den Einfluß von A-QA 39 Cl erneut bestätigt.

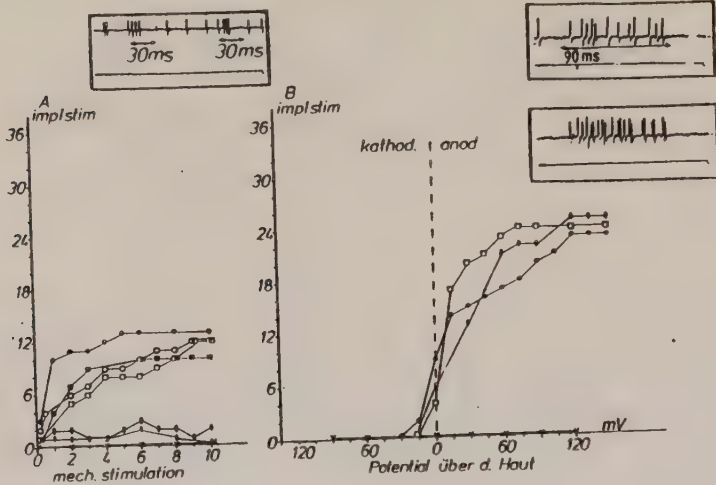


Abb. 54 a. Freier Neuromast: zwei Fasern

Die kompetitive Hemmung des A-QA 39 Cl.

A: Impulsantwort auf steigenden mech. Reiz
Inset: 50 mM CaCl_2 , 0,5 rel. E.

B: Impulsantwort auf elektr. Rechteckreize
Insets: oben: 2 mM CaCl_2 + 0,5 mM A-QA, anod. 15 mV
unten: 2 mM CaCl_2 + 0,5 mM A-QA, anod. 45 mV

Versuchsreihenfolge:

- o 2 mM CaCl_2
- 50mM CaCl_2
- 50mM CaCl_2 + 0,5 mM A-QA 39 Cl
- ◊ 2 mM CaCl_2 + 0,5 mM A-QA 39 Cl
- 50mM CaCl_2 + 0,5 mM A-QA 39 Cl
- ◆ 50mM CaCl_2 + 5 mM A-QA 39 Cl
- x 2 mM CaCl_2 + 5 mM A-QA 39 Cl

Anzahl der Messungen $n = 3$ Standardlösung : 2 mM CaCl_2				
Ionenlösungen und Konzentrationen	Empfindlich- keitsänderung gegenüber Standard in % Mittelwerte aus allen Versuchen $\bar{x}$		Standard- abweichung $s \sqrt{n-1}$	
	mech.	el.	mech.	el.
2 mM CaCl_2 + 0,5 mM A-QA 39 Cl	-75	-0,25	9,5	0,5
2 mM CaCl_2 + 5 mM A-QA 39 Cl	-100	-100	0,0	0,0
2 mM CaCl_2 (Reversib. nach II)	-58,1		5,4	

Abb. 54 b. Mittelwerte und Standardabweichungen zu
weiteren Versuchen der Abb. 53.a.
Prozentuale Empfindlichkeitsänderung
2 mM $\text{CaCl}_2 = 100\%$

Einschließlich des soeben beschriebenen A-QA 39 Cl konnten bei allen beschriebenen hemmenden Substanzen die gleichen Wirkungen auf die Mechanorezeptoren nachgewiesen werden: Die Mechanosensitivität sowie die Elektrosensitivität werden blockiert, wobei beide vom Konzentrationsverhältnis Ca^{2+} /Inhibitor abhängen. Eine mittlere Konzentration des hemmenden Ions ist in ihrer Wirkung leichter reversibel und führt zu vollständiger Unterdrückung der mechanischen Empfindlichkeit, während die elektrische Empfindlichkeit noch voll erhalten ist. Sie wird erst bei höheren Konzentrationen unterdrückt, deren Wirkung schwerer reversibel ist.

Da die Reihenfolge der vorangegangenen Experimentalreihen immer beibehalten wurde, d.h. die Organe zuerst mechanisch und dann elektrisch gereizt wurden, wurde zusätzlich überprüft, ob die elektrische Reizung die Rezeptoren gegenüber mechanischer Reizung sensibilisiert hat. Dabei konnten keine Veränderungen festgestellt werden (s.a. Kap. 3.4.2., 3.4.3.).

3.6.3.5. Streptomycin

Streptomycin stellt in der Gruppe der hemmenden Ionen eine Ausnahme dar. Die Sensibilität gegenüber mechanischer Reizung wird in bekannter Weise blockiert, während die Reaktion gegenüber elektrischer Reizung verändert ist:

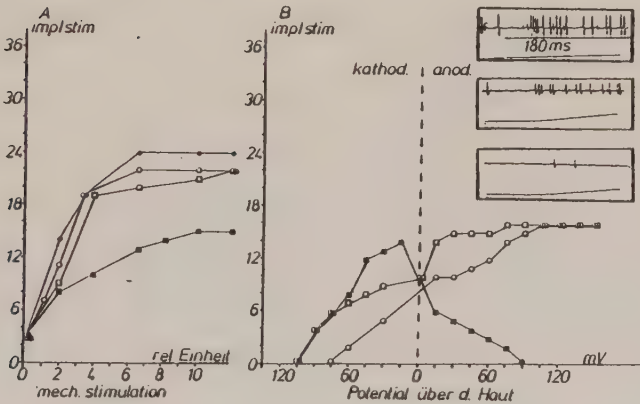


Abb. 55. Freier Neuromast: Einzelfaser

Die Wirkung von Streptomycin auf die Empfindlichkeit der Rezeptoren.

A: Impulsantwort auf steigende mech. Reizung

B: Impulsantwort auf mittlere mech. Reizung und zusätzliche DC-Polarisation

Insets: oben: 10 mM CaCl₂, anod. 75 mV

mitte: 10 mM CaCl₂ + 0,5 g/l Strep.
kath. 30 mV

unten: 10 mM CaCl₂ + 0,5 g/l Strep.
anod. 75 mV

Versuchsreihenfolge:

○ 10 mM CaCl₂ ● 100 mM CaCl₂

◻ 100 mM CaCl₂ + 0,5 g/l Strep.

■ 10 mM CaCl₂ + 0,5 g/l Strep.

Unter Streptomycineinfluß führt kathodische elektrische Reizung niedriger Intensität erst zu einer geringfügigen Erhöhung der Impulsantwort, um dann mit zunehmender Intensität die Impulsantwort vollständig zu unterdrücken.

Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Ionen führt jedoch hier anodische Reizung, ebenso wie kathodische Reizung, zur Unterdrückung der Impulsantwort.

Das folgende Bild verdeutlicht, daß es sich hier auch um eine kompetitive Hemmung handelt, da sich der Streptomycineffekt durch Erhöhen der Ca^{2+} -Konzentration wieder aufheben läßt.

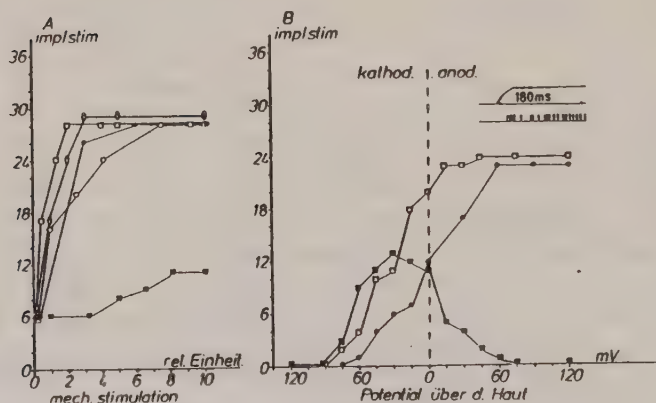


Abb. 56.a. Freier Neuromast: Einzelfaser

Kompetitive Hemmung des Streptomycins

A: Impulsantwort auf steigende mech. Reize

B: Impulsantwort auf mittlere mechanische Reizung und zusätzlicher DC-Polarisation

Versuchsreihenfolge:

-○ 2 mM CaCl_2 → ● 10 mM CaCl_2 → ◐ 100 mM CaCl_2

-■ 100 mM CaCl_2 + 0,5 g/l Streptomycinsulfat

-◻ 10 mM CaCl_2 + 0,5 g/l Streptomycinsulfat

Anzahl der Messungen n = 5(I), 3(II, IV) 4(III) Standardlösung : Leitungswasser (I) 10 mM CaCl ₂ (II-IV)				
Ionenlösungen und Konzentrationen	Empfindlich- keitsänderung gegenüber Standard in % Mittelwerte aus allen Versuchen $\bar{x}$		Standard- abweichung $\sigma \cdot 10^{-1}$	
	mech.	el.	mech.	el.
(I) Lw + 0,05 g/l Strep.	-50,8	Spikeab- nahme b. anod. Vorpul.	5,8	
(II) 100 mM CaCl ₂ + 0,5 g/l Strep.	-4,5	-1,1	5,8	1,4
(III) 10 mM CaCl ₂ + 0,5 g/l Strep.	-58,4	Spikeab- nahme b. anod. Vorpul.	14,09	
(IV) 2 mM CaCl ₂ + 0,5 g/l Strep.	-88,0	-100	0,9	0,0

Abb. 56 b. Mittelwerte und Standardabweichungen zu
weiteren Versuchen der Abb. 55 und 56 a.
Prozentuale Empfindlichkeitsänderung
10 mM CaCl₂ = 100%

Die Blockade der Empfindlichkeit gegenüber mechanischer Reizung unter 10 mM CaCl_2 + Streptomycinsulfat kann durch Erhöhen der Ca^{2+} -Konzentration auf 100 mM vollständig kompensiert werden.

Ebenso wird die veränderte Elektrosensitivität normalisiert.

Beide Sensibilitätsverluste sind innerhalb einer Minute reversibel, was durch folgende zeitliche Darstellung verdeutlicht wird:

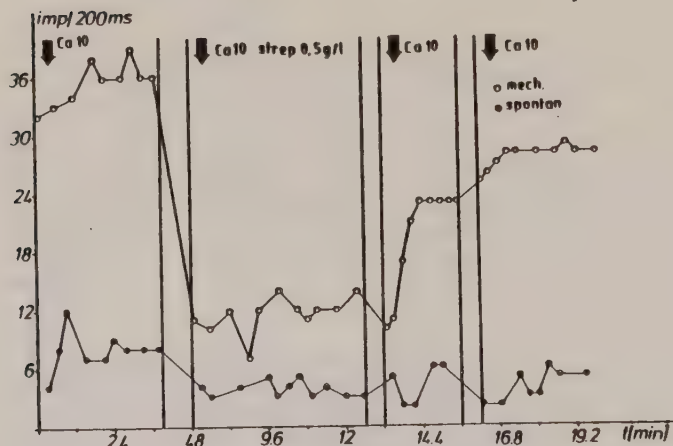


Abb. 57. Freier Neuromast: Einzelfaser

Zeitlicher Verlauf der Hemmung und Reversibilität bei Streptomycin.

Die Säulen geben den Lösungswechsel an (Einzelbeispiel aus zwei Messungen)

Zeitfenster=200 ms (Methodik s.S.95-97 f.EDTA)

Bei geringeren Streptomycinkonzentrationen genügen bereits 2 mM CaCl_2 , um die ursprüngliche Sensibilität des Rezeptors zurückzuerlangen.

Von allen untersuchten Ionen ist die Reversibilität der Streptomycin-Hemmung am größten.

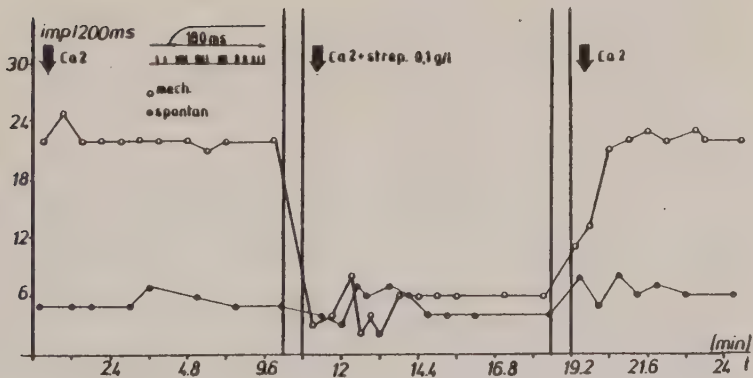
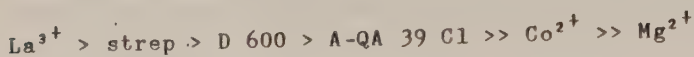


Abb. 58. Freier Neuromast: zwei Fasern
Zeitlicher Verlauf der Reversibilität nach
0,1 g/l Streptomycinsulfat
Die Säulen zeigen den Lösungswechsel an

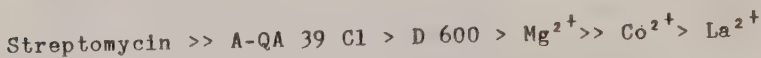
Zusammenfassend kann anhand der beschriebenen Ergebnisse für die molare Effektivität der getesteten Substanzen auf die Empfindlichkeit der Rezeptoren folgende Beziehung aufgestellt werden:



Folgende Konzentrationen dieser Ionen können in ihrer hemmenden Wirkung gleichgesetzt werden:

0,1 mM La^{3+}	+	5 mM Ca^{2+}
0,14 mM strep	+	2 mM Ca^{2+}
0,2 mM D 600	+	2 mM Ca^{2+}
0,5 mM A-QA	+	2 mM Ca^{2+}
30 mM Co^{2+}	+	2 mM Ca^{2+}
60 mM Mg^{2+}	+	0,5 mM Ca^{2+}

Für die Reversibilität kann folgende Beziehung aufgestellt werden:



In allen Fällen ist die Reversibilität nicht nur vom jeweiligen Ion abhängig, sondern auch von der Konzentration der applizierten Lösung:

Je höher die Konzentration des blockierenden Ions, umso schlechter ist seine Wirkung reversibel. Nach sehr hohen Konzentrationen eines Inhibitors können auch sehr hohe Ca^{2+} -Konzentrationen die Sensibilität der Rezeptoren nicht mehr erhöhen.

Im allgemeinen fällt auf, daß die Streuungen der Meßpunkte innerhalb einer Versuchsreihe mit der Effektivität des Ions zunehmen, wobei D 600 und A-QA 39 Cl eine Ausnahme darstellen, da die Streuungen d.h. Standardabweichungen in diesen Versuchsreihen sehr klein sind (s. Abb. 52 b., 54 b.).

Die Streuungen innerhalb der Meßreihen zu den La^{3+} -Versuchen jedoch, welches ein sehr effektives Inhibitorion darstellt, sind ziemlich groß (Abb. 42 b., 43 b), werden bei Co^{2+} geringer, bei Mg^{2+} noch geringer (Abb. 44 b., 48 b.).

Gleichzeitig sind die Standardabweichungen innerhalb einer Versuchsreihe für ein Ion bei einem mittleren Ca^{2+} /Inhibitorverhältnis (d.h. Abnahme der Empfindlichkeit auf 50%) am größten.

4. Diskussion

Die Ergebnisse des vorangegangenen Kapitels können in der folgenden Graphik zusammengefasst werden:

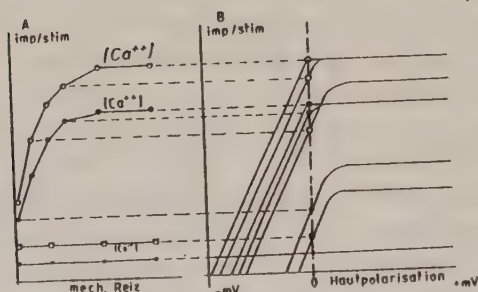


Abb. 59. Die Wirkung von Ca^{2+} -Mangel und inhibitorischen Ionen auf die Empfindlichkeit der Organe gegenüber mechanischer und elektrischer Reizung

- A: steigende mechanische Reize und ihre Antwort in der afferenten Faser
- B: Die elektrisch modulierte Antwort auf mechanische Reizung verschiedener Reizstärken, abnehmender Ca^{2+} -Konzentrationen und unter Einfluß verschiedener Inhibitoren.
- o hohe Ca^{2+} -Konzentration
 - mittlere Ca^{2+} -Konzentration, geringe Inhibitor-Konzentration
 - geringe Ca^{2+} -Konzentration, mittlere Inhibitor-Konzentration
 - starker Ca^{2+} -Mangel, große Inhibitor-Konzentration

Aus den vorangegangenen Kurven können folgende Schlüsse gezogen werden:

Der Mechanorezeptor antwortet auf steigende mechanische Reizung mit steigender Impulszahl bis zu einer Sättigung, welche auch durch sehr hohe mechanische Reizung nicht mehr überschritten werden kann.

Diese Mechanosensibilität ist durch elektrische Vorpolarisation des Organs modifizierbar, wobei anodische Vorpolarisation die Empfindlichkeit erhöht, während sie durch kathodische Vorpolarisation erniedrigt wird.

Wird eine Impulsantwort auf mittlere mechanische Reizung durch anodische Vorpolarisation erhöht, dann erfolgt diese Erhöhung mit steigender Vorpolarisationsspannung bis zu einem Sättigungsniveau, welches niedriger liegt als jenes Sättigungsniveau, das durch hohe mechanische Reizung allein ausgelöst werden kann. Somit hat jeder mechanische Reiz sein eigenes elektrisches Sättigungsniveau.

Befindet sich die Reizantwort auf hohe mechanische Reize in der Sättigung, so kann diese Antwort elektrisch nicht mehr erhöht werden.

Die Empfindlichkeit der Rezeptoren kann außerdem durch Ca^{2+} -Mangel und durch inhibitorische Ionen herabgesetzt werden. Die Wirkung dieser Ionen ist allein vom Verhältnis Ca^{2+} /Inhibitor abhängig. Dabei wirkt eine mittlere Ca^{2+} -Konzentration oder eine geringe Inhibitorkonzentration auf die Organe wie eine verminderte mechanische Reizung. Erst geringe Ca^{2+} -Konzentration und mittlere Inhibitorkonzentration machen das Organ unempfindlich gegenüber mechanischer Reizung, während es gegenüber elektrischer Stimulation noch modifizierbar bleibt.

Hohe Inhibitorkonzentrationen, sowie starker Ca^{2+} -Mangel führen zu vollständigem Verlust der Mechano- und Elektrosensitivität (für Elektrorezeptoren s. Roth 1971 und Bauswein 1976).

Diese Ergebnisse werden durch folgende Ausführungen näher erläutert:

1. Daß der Reaktionsort der elektrischen Reizung, sowie der inhibitorischen Ionen, an der apikalen Membran zu suchen ist, wird durch folgende Ausführungen deutlich:

Alle verwendeten Ionen (La^{3+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , D 600 und A-QA 39 Cl) blockieren den Ca^{2+} -Einfluß kompetitiv und reversibel.

Für diese Wirkung ist die freie Permeabilität aller dieser Ionen zu ihrem Bindungsort Voraussetzung.

Das schnelle Eintreten ihrer blockierenden Wirkung, sowie die relativ problemlose Reversibilität der Inhibitoren, lassen eine Erklärung für intrazelluläre Reaktionen nicht zu.

Besonders deutlich wird dies anhand der Streptomycin-Wirkung, deren Reversibilitätsdauer weniger als eine Minute beträgt (s. Abb. 55., 56.).

Aus diesen Gründen muß der Reaktionsort der Inhibitoren in der apikalen Membran der Sinneszelle liegen.

Dabei blockieren diese Inhibitoren nicht nur die Empfindlichkeit gegenüber mechanischer Reizung, sondern auch gegenüber elektrischer Reizung, wobei die Höhe des Sättigungsplateaus der mechanischen und der elektrischen Reiz-Antwort-Kurven allein von der Ca^{2+} -Konzentration bzw. vom Verhältnis Ca^{2+} /Inhibitor abhängig ist.

Durch anodische Vorpolarisation kann die Antwort auf einen mittleren mechanischen Reiz genau bis zu diesem Sättigungsplateau erhöht werden.

Streptomycin jedoch verändert die Wirkung der Hauptpolarisation nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ.

Da sein Reaktionsort, sowie der der anderen Ionen, auf die apikale Membran der Sinneszellen beschränkt werden konnte, muß auch die Wirkung der Polarisation in dieser Membran gesucht werden.

Ein weiteres Indiz für diese Polarisationswirkung ist in den Ergebnissen der Latenzmessungen zu finden.

Die Transduktionszeit r (vom Beginn eines elektrischen Reizes an bis zum Auftreten des ersten Spikes am Entstehungsort) sollte, unabhängig von der verwendeten Reizstärke, etwa gleich sein, würde man die Wirkung der Polarisation in der postsynaptischen Membran suchen.

Die starke Streuung der Transduktionszeiten r bei niedrigen Polarisationsstärken und die Verkürzung von 12 ms auf 1,4 (1,7) ms mit zunehmender Reizstärke, schließt eine postsynaptische Wirkung der Polarisation aus und unterstützt die obengenannte These.

Teeter und Bennett (1981) fanden bei Kryptopterus am homologen ampullären Elektrorezeptor eine minimale synaptische Übertragungszeit von 1,7 μ s.

2. Anodische Vorpolarisation, d.h. diejenige Polarität, welche die Empfindlichkeit der Rezeptoren erhöht, stellt eine Hyperpolarisation der apikalen Sinneszellmembran dar.

Sie könnte wirken:

als treibende Kraft für den Einstrom der positiv geladenen Ca^{2+} -Ionen,

in einer Erhöhung der Membranpermeabilität,

als Einfluß auf eine Wirkung des Ca^{2+} als Cofaktor.

Die Wirkung der elektrischen Reizung auf die Transmitterausschüttung der basalen Sinneszellmembran durch Depolarisation konnte ausgeschlossen werden, da sonst der blockierende Effekt der verschiedenen Inhibitoren durch elektrische Reizung aufgehoben werden könnte und die Antwort auf einen mechanischen Reiz jeder Stärke, bis zur Sättigung der afferenten Nervenfaser, erhöht werden könnte.

Die Hyperpolarisation der apikalen Membran stellt anhand ihrer Polarität (Zellinneres negativ) eine treibende Kraft für die zweifach positiv geladenen Calciumionen dar. Wenn nun dieser Effekt alleine ausschlaggebend für die elektrische Sensibilität der Rezeptoren wäre, dann müßten die Organe gleichermaßen auf mechanische und elektrische Reizung reagieren.

Da jedoch bestimmte Inhibitor-Konzentrationen zu einem vollständigen Verlust der Mechanosensibilität führen, während die Elektrosensibilität noch vollständig erhalten ist, muß die Wirkung der elektrischen Reizung noch in einer Veränderung der Permeabilität der apikalen Sinneszellmembran gesucht werden.

Möglicherweise wird dieser Einfluß durch die veränderte Menge der aktivierten Ionen-Kanäle oder durch die Art ihrer Aktivierung (eng oder weit geöffnet) hervorgerufen, womit der Einstrom der Ca^{2+} -Ionen pro Zeiteinheit variiert werden könnte.

Ein weiterer Einfluß auf spezifische Ca^{2+} -Bindungsstellen kann auch nicht ausgeschlossen werden.

3. Der Rezeptorstrom in die Sinneszelle wird von Ca^{2+} -Ionen getragen.

In vielen biologischen Membranen spielt Ca^{2+} eine wichtige Rolle als Cofaktor für die Erregbarkeit, indem es über die Veränderung der Na^{+} - K^{+} - Permeabilität die Entstehung eines Na-Spikes beeinflusst (Frankenhaeuser 1957, Frankenhaeuser u. Hodgkin 1957, Kerkut u. Gardener 1967, Lüttgau u. Glitsch 1976).

In dieser Funktion ist es durch Mg^{2+} , Co^{2+} und La^{3+} ersetzbar (Narahashi 1966, Blaustein 1967, Hafemann 1968, Hagiwara 1973).

Die Sensibilität der freien Neuromasten des Aales wird jedoch durch diese Ionen, indem sie die Ca-Wirkung kompetitiv hemmen, blockiert.

Diese kompetitive Hemmung wurde bereits in anderen biologischen Systemen beschrieben (del Castillo et al. 1954, Jenkinson 1957, Miledi et al. 1969, Miledi 1971, Langer et al. 1972, Weiss 1974, Kita et al. 1973, Weihe 1977).

In diesem Fall ist die Rolle des Ca^{2+} nicht die eines Cofaktors, sondern die des Stromträgers (Hagiwara 1967, 1973, Baker 1972, 1973, 1975, Miledi 1970).

Der Ca-Einstrom durch eine Nervenmembran kann in zwei Phasen aufgeteilt werden: in eine erste Phase durch den TEA- abhängigen K-Kanal "early channel", und die zweite Phase durch einen spezifischen Ca-Kanal, den "late channel" (Baker 1971, 1973, Lüttgau et al. 1976).

Baker (1972) konnte zeigen, daß allein der "late Ca-channel", also die zweite Phase des Ca-Einstromes, durch diese Ionen blockiert werden kann.

Daß der Rezeptorstrom der freien Neuromasten durch einen solchen spezifischen Ca^{2+} -Kanal (late channel) getragen wird, kann eindeutig durch die hemmende Wirkung von D 600 und A-QA 39 Cl belegt werden.

Diese Stoffe konnten in Herzmuskelzellen als spezifische Ca^{2+} -Kanalblocker klassifiziert werden (Mayer et al. 1972, Kolhard 1972, Mc Donald et al. 1980, Pelzer et al. 1982).

4. Die Streptomycinwirkung auf die Rezeptoren führt zu der Vermutung, daß die Ca^{2+} -Wirkung nicht alleine in einer Stromträgerfunktion zu suchen ist.

In vorangegangenen Beschreibungen konnte bewiesen werden, daß Ca^{2+} als Stromträger durch spezifische Kanäle der apikalen Membran wirkt.

Mit diesen Erkenntnissen ist jedoch noch nicht erklärt, wie Streptomycin, welches die Sensibilität der Organe auch kompetitiv mit Ca^{2+} und reversibel hemmt, gegenüber der elektrischen Reizung qualitativ andere Wirkung als die anderen Inhibitoren zeigt.

Während EDTA über die Reduktion des Ca^{2+} -Angebotes wirkt (wie für Antibiotika auch beschrieben wurde: Reed et al. für A 23187, 1972), und A-QA 39 Cl und D 600 die Ca-Kanäle inaktiviert, könnte Streptomycin z.B. spezifische Ca^{2+} -Bindungsstellen besetzen, wie es Shiozawa et al. (1979) schon für Neomycin beschrieben.

Interessant ist auch, daß Streptomycin die Empfindlichkeit der Rezeptoren des Innenohrs herabsetzt (Hudspeth 1983), obwohl deren Rezeptorstrom nachweislich von K^+ -Ionen getragen wird (siehe auch TEA-Wirkung, Katsuki 1966).

K^+ -Ionen scheinen bei der Funktion der freien Neuromasten des Aales jedoch keine wichtige Rolle zu spielen, wie die Wirkungslosigkeit der TEA-Zugabe in das Außenmedium beweist. Außerdem wurden fast alle Versuche in K^+ -freiem Medium durchgeführt.

Es bietet sich für die Streptomycinwirkung also die Erklärung an, daß es kompetitiv spezifische Ca^{2+} -Bindungsstellen besetzt und somit über eine Änderung der Membraneigenschaften die Mechano- und Elektrosensibilität beeinflusst.

Um über diese spezifischen Membran-physiologischen Wechselwirkungen genauere Aussagen machen zu können, müßten weitere Erkenntnisse vorhanden sein, um ein Modell für die Funktionsweise und Morphologie spezifischer Ca^{2+} -Kanäle aufstellen zu können.

Llinás (1982) hat dies in seinem Rosettenmodell der Ca^{2+} -Kanäle in der Riesensynapse von Loligo versucht darzustellen.

Er vermutet fünf rosettenförmig angeordnete Untereinheiten, welche unabhängig voneinander aktiviert werden müssen, um den Kanal zu öffnen.

Bei der Aufstellung eines solchen Modells für die Funktionsweise der Ca^{2+} - Kanäle, sowie einer Hypothese zum Transduktionsprozess dürfen die Ergebnisse der Transduktionszeitmessungen nicht außer Acht gelassen werden. Die kurzen Transduktionszeiten r, welche die Permeabilitätsänderung der apikalen Membran, die Weiterleitung des Rezeptorpotentials, sowie die synaptische Übertragung beinhalten setzen ein schnell reagierendes System voraus. Da Teeter und Bennett (1981) für den ampullären Elektrorezeptor eine minimale Übertragungszeit von 1.7ms postulieren, muß im Falle der Mechanorezeption bei den ermittelten Werten der Transduktionszeiten, für die Permeabilitätsänderung der apikalen Membran, eine verhältnismäßig kurze Zeitspanne angesetzt werden.

Die Ergebnisse, welche an den freien Neuromasten des Aales gewonnen werden konnten, decken sich mit veröffentlichten Daten über andere Mechanorezeptoren. Über die Richtspezifität der Zellen kann an dieser Stelle keine detaillierte Aussage gemacht werden. Die Diskrepanz in den Ergebnissen von Vorversuchen (Abb.20) mit bekannten Daten der Literatur und mit Daten dieser Arbeit (Abb.21), kommt wohl durch die mangelnde Kalkulierbarkeit der hier verwendeten mechanischen Reizform zustande. Für eine genauere Überprüfung müßte die mechanische Reizung spezialisiert werden. Mit neueren Methoden der Membranphysiologie und Biochemie könnten die hier gewonnenen Erkenntnisse über die Funktionsweise der apikalen Membran erweitert werden.

5. Zusammenfassung

Die Empfindlichkeit der freien Neuromasten des Aales gegenüber mechanischer sowie elektrischer Reizung wurde untersucht.

Die Impulsantworten der afferenten Fasern auf diese Reizformen wurden gemessen.

Der Einfluß verschiedener Ionen in der Lösung über den Organen, sowie der des Potentials über der Haut auf die Empfindlichkeit gegenüber den genannten Stimulationen wurde getestet.

Das Hautpotential, welches sich in Gegenwart der getesteten Ionenlösungen um einige mV ändert, hat keinen Einfluß auf die Sensibilität der Rezeptoren gegenüber mechanischer Reizung.

Kathodische Vorpolarisation (das Fischinnere ist positiv) führt zur Abnahme der Spontanktivität und zur Unterdrückung der Empfindlichkeit gegenüber mechanischer Stimulation.

Ab einer bestimmten Polarisationsstärke ist die Sensibilität vollständig unterdrückt.

Auch starke mechanische Reizung ist nicht mehr in der Lage, Impulse in der afferenten Faser auszulösen.

Anodische Polarisation (das Fischinnere ist negativ) erhöht die Empfindlichkeit der Organe auf mechanische Reizung und auf die Spontanaktivität bis zu einem Sättigungsniveau, welches auch durch hohe elektrische Reize nicht mehr überschritten werden kann.

Dabei hat jeder mittlere mechanische Reiz, dessen Antwort elektrisch erhöht wird, sein eigenes Sättigungsniveau.

Antworten auf hohe mechanische Reize, welche auch durch stärkere mechanische Reizung nicht mehr erhöht werden können (mechanische Sättigung), können auch durch zusätzliche starke anodische Vorpolarisation nicht mehr erhöht werden.

Die Empfindlichkeit der Rezeptoren ist von der Ca^{2+} -Konzentration über der apikalen Membran abhängig.

Erhöhte Ca^{2+} -Konzentration führt zur Erhöhung

der Sensibilität der Organe.

K^+ und Na^+ haben keinen Einfluß.

Ionen wie La^{3+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , D 600 und A-QA 39 Cl blockieren die Mechanosensibilität und die Elektrosensitivität der Rezeptoren.

Die Stärke der Inhibition ist von der Konzentration des einzelnen Ions, sowie vom Verhältnis der Ca^{++} -Konzentration zur Inhibitor-Konzentration abhängig (kompetitive Hemmung).

Die zur Unterdrückung der Empfindlichkeit führende Konzentration, sowie die Reversibilität ist für jedes Ion spezifisch. Dabei gibt es für jedes Ion eine mittlere Konzentration, welche die Empfindlichkeit auf mechanische Reize bereits vollständig unterdrückt, die Empfindlichkeit gegenüber elektrischer Reizung jedoch noch unbeeinflusst läßt.

Hohe Konzentrationen blockieren beide genannten Reizformen.

Streptomycin führt ebenso wie alle anderen Ionen zu einer kompetitiven Hemmung mit Ca^{2+} .

Dabei erniedrigt anodische Polarisierung jedoch die Empfindlichkeit gegenüber mechanischer Stimulation, welche in allen anderen genannten Fällen zur Erhöhung der Empfindlichkeit geführt hatte.

Die oben genannten Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß der Einwärtsstrom in die Rezeptoren über spezifische Kanäle von Ca^{2+} getragen wird.

Die genannten Inhibitoren vermindern oder blockieren diesen Stromfluß, wobei Streptomycin die Ca^{2+} - Bindungsstellen in anderer Art und Weise blockiert als die übrigen Inhibitoren.

Die Aktivität der Ca^{2+} -Kanäle in der apikalen Sinneszellmembran wird durch mechanische Reizung in anderer Art und Weise modifiziert als durch elektrische Reizung.

6. Literaturverzeichnis

- Alnaes, A. (1973): Two types of lateral line afferents in the eel (*anguilla anguilla*)
Acta. Physiol. Scand. 87: 535-548
- Baker, P.F., Hodgkin, A.L., Ridgway, E.B. (1971):
Depolarisation and calcium entry in squid giant axons.
J. Physiol. 218: 709-755.
- Baker, P.F. (1972): Transport and metabolism of calcium ions in nerve.
Progr. Biophys. Molec. Biol. 24: 177-223.
- Baker, P.F., Meves, H., Ridgway, E.B. (1973): Effects of manganese and other agents on the calcium uptake that follows depolarisation of squid axons.
J. Physiol. 231: 511-526.
- Baker, P.F., Meves, H., Ridgway, E.B. (1973): Calcium entry in response to maintained depolarisation of squid axons.
J. Physiol. 231: 527-548.
- Baker, P.F., Glitsch, H.G. (1975): Voltage dependent changes in the permeability of nerve membranes to calcium and other divalent cations.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 270: 389-409.
- Bauswein, E. (1976): Die Bedeutung der Ca-Ionen für die Erregungsbildung und die Adaptation beim ampullären Elektrozepthor des Zwergwelses *Ictalurus nebulosus*.
Dissertation der Universität München

- Bergeijk, W.A. van (1967): The evolution of vertebrate hearing. In: Contributions to sensory physiology (W. Neff ed.). Acad. Press, New York Vol.2.
- Blaustein, M.P. (1967): Phospholipids as ion exchangers: implications for a possible role in biological membrane excitability and anaesthesia. Biochim. Biophys. Acta 135: 653-668.
- Corey, D.P., Hudspeth, A.J. (1979): Ionic basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell. Nature, vol. 281: 675-677.
- Davis, H. (1965): A model for transducer action in the cochlea. Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 30: 180-190
- del Castillo, J., Engbaek, L. (1954): The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. J. Physiol. 124: 370-384.
- Duvall, A., Wersäll, J. (1963): Site of action of streptomycin upon inner ear sensory cells. Acta oto-laryngol. 57: 581-598.
- Flock, A., Wersäll, J. (1962): A study of orientation of the sensory hairs of the receptor cells in the lateral line organ of fish with special reference to the function of the receptors. J. Cell. Biol. 13: 19-27.

- Flock, A. (1967): Ultrastructure and function in the lateral line organs. In: Lateral line detectors (P. Cahn ed.) 163-197.
- Flock, A. (1971): Sensory transduction in hair cells
In: Handbook of sensory physiology
(W.R. Loewenstein ed.), Springer, 1: 396-441.
- Flock, A., Jörgenson, M., Russel, I. (1973): The physiology of individual hair cells and their synapses. In: Basic mechanisms of hearing (A.R. Møller ed.): 273-306.
- Flock, A., Lam, D.M.K. (1974): Neurotransmittersynthesis in inner ear and lateral sense organs.
Nature 249: 142-144.
- Frankenhaeuser, B. (1957): The effect of calcium on the myelinated nerve fibres.
J. Physiol. 137: 245-260.
- Frankenhaeuser, B., Hodgkin, A.L. (1957): The action of calcium on the electrical properties of squid axons.
J. Physiol. 137: 218-244.
- Furukawa, T., Ishii, Y. (1967): Neurophysiological studies on hearing in goldfish.
J. Neurophysiol. 30: 1377-1403.
- Görner, P. (1963): Untersuchungen zur Morphologie und Elektrophysiologie des Seitenlinienorgans vom Krallenfrosch (*Xenopus laevis* daudin).
Zeitschr. Vergl. Physiol. 47: 316-338.

- Hafemann, D.R. (1969): Effects of metal ions on action potentials of lobster giant axons.
Comp. Biochem. Physiol. 29: 1149-1161.
- Hagiwara, S., Takahashi, K. (1967): Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane.
J. Gen. Physiol. 50: 583-601.
- Hagiwara, S. (1972): Na and Ca channels. In: Membrane transduction mechanisms. (A. Cone, E. Dowling ed.), Vol:33. 189-197.
- Hagiwara, S. (1973): Ca spike.
Advan. Biophys. 4: 71-102.
- Hayashi, F., Inoue, H., Amakawa, T., Yoshioka, T. (1980):
31 P NMR study of neomycin toxicity.
Proc. Japan. Acad. 56B: 597-602.
- Hama, K. (1965): Some observations on the fine structure of the lateral line organ of the Japanese sea eel *Lycoteuthis nystromi*.
J. Cell Biol. 24, part 2: 193-210.
- Hama, K. (1978): A study of the fine structure of the pit organ of the common Japanese sea eel (*Conger myriaster*).
Cell. Tiss. Res. 189: 375-388.
- Harder, W. (1965): Anatomie der Fische. Handbuch der Binnenfischerei Mitteleuropas II A: 64-67.
- Harris, G., Flock, A. (1967): Spontaneous and evoked activity from *Xenopus laevis* lateral line.
In: Lateral line detectors (P. Cahn ed.).
135-161.

- Harris, G., Frischkopf, L., Flock, A. (1969):
Receptor potentials in the hair cells of
mudpuppy lateral line.
J. Acoust. Soc. Amer. 45: 300-301.
- Harris, G., Flock, A., Frischkopf, L. (1970):
Receptor potentials from the hair cells
of lateral line.
Science 167: 76-79.
- Hudspeth, A.J., Corey, D.P. (1977): Sensitivity po-
larity and conductance change in the res-
ponse of vertebrate hair cells to controlled
mechanical stimuli.
Proc. Natl. Acad. Sci. 74, no. 6: 2407-2411.
- Hudspeth, A.J., Jacobs, R. (1979): Stereocilia mediate
transduction in vertebrate hair cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 1506-1509.
- Hudspeth, A.J. (1981): Extracellular current flow
and the site of transduction by vertebrate
hair cells.
J. Neurosci. 2, no. 1: 1-10.
- Hudspeth, A.J. (1983): Die Haarzellen des Innenohrs.
Spektr. Wiss. Vol. 3: 108-119.
- Hudchinson, N.A., Koles, Z.J., Smith, R.S. (1970):
Conduction velocity in myelinated nerve
fibres of *Xenopus laevis*.
J. Physiol. 208: 279-289.
- Jenkinson, D.H. (1957): The nature of the antagonism
between calcium and magnesium ions at the
neuromuscular junction.
J. Physiol. 138: 434-444.

- Johnstone, C.G., Schmidt, R.S., Johnston, B.N. (1963):
Sodium and potassium in vertebrate cochlea
endolymph as determined by flame micro-
spectrophotometry.
Comp. Biochem. Physiol. 9: 335-341.
- Katsuki, Y., Yanagisawa, K., Kanzaki, J. (1966):
Tetraethylammonium and tetrodotoxin.
Effects on cochlea potentials.
Science 151, no. 3717: 1544-1545.
- Katsuki, Y., Yanagisawa, K., Tester, A.I., Kendall, J.I.
(1969): Shark pit organs: Response to
chemicals:
Science: 163: 405-407.
- Katsuki, Y., Hashimoto, T., Yanagisawa, K. (1970):
The lateral line organ of shark as a
chemoreceptor.
Adv. Biophys. 1: 1-51.
- Katsuki, Y., Hashimoto, T., Kendall, I.J. (1971):
The chemoreception in the lateral line
organs of teleosts.
Jap. J. Physiol. 21: 99-118.
- Katz, B., Miledi, R. (1969): The effect of divalent
cations on transmission in the squid
giant synapse.
Publ. Staz. Zool. 37: 303-310.
- Katz, B., Miledi, R. (1970): Further study of the role
of calcium in synaptic transmission.
J. Physiol. 207: 789-801.

- Kerkut, G.A., Gardener, D.R. (1967): The role of calcium ions in the action potentials of *Helix aspersa* neurons.
Comp. Biochem. Physiol. 20: 147-162.
- Kita, H., van der Kloot, W. (1973): Action of Co and Ni at the frog neuromuscular junction.
Nature New Biol. 245: 52-53.
- Kohlhard, M., Bauer, B., Krause, H., Fleckenstein, A. (1972): New selective inhibitors of the transmembrane Ca conductivity in mammalian myocardial fibers. Studies with the voltage clamp technique.
Exper. 28, no. 3: 288-289.
- Kroese, B.A., van der Zalm, I.M., van der Bercken, J. (1980): Extracellular receptor potentials from the lateral line organ of *Xenopus laevis*.
J. exp. Biol. 86: 63-77.
- Kroese, B.A., van den Bercken, J. (1980): Dual action of ototoxic antibiotics on sensory hair cells.
Nature 283: 395-397.
- Langer, G.A., Frank, J.S. (1972): Lanthanum in heart cell culture.
J. Cell. Biol. 54: 441-455.
- Llinas, R.R. (1982): Calcium in synaptic transmission.
Scient. Amer. 247, no. 4: 39-47.
- Lüttgau, H.C., Glitsch, H. (1976): Membrane physiology of nerve and muscle fibers.
Fortschr. Zool. 24: 1-32.

Matsuura, S., Ikeda, K., Furukawa, T. (1968): Ouabain and streptomycin: Their different loci of action on saccular hair cells in goldfish. Science 160: 1117-1119.

Mayer, C.I., van Breemen, C., Gasteels, R. (1972): The action of lanthanum and D 600 on the calcium exchange in the smooth muscle cells of the guinea pig *Taenia coli*. Pflüg. Arch. 337: 333-350.

Mc Donald, T.F., Pelzer, D., Trautwein, W. (1980): On the mechanisms of slow calcium channel block in heart. Pflüg. Arch. 385: 175-179.

Miledi, R. (1971): Lanthanum ions abolish the "calcium response" of nerve terminals. Nature 229: 410-411.

Münz, H. (1979): Morphology and innervation of the lateral line system in *Sarotherodon niloticus* L. (Cichlidae, Teleostei). Zoomorph. 73-86.

Murray, R.W., Potts, W.T.W. (1961): The composition of the endolymph, perilymph and other body fluids of elasmobranchs. Comp. Biochem. Physiol. 2: 65-75

Narahashi, T. (1966): Dependence of excitability of cockroach giant axons on external divalent cations. Comp. Biochem. Physiol. 19: 759-774.

- Papst, A. (1976): Number and location of the sites of impulse generation in the lateral line afferents of *Xenopus laevis*.
J. Comp. Physiol. 114: 51-67.
- Pelzer, D., Trautwein, W., Mc Donald, T.F. (1982): Calcium channel block and recovery from block in mammalian ventricular muscle treated with organic channel inhibitors.
Pflüg. Arch. 394: 97-105.
- Reiter, W. (1984): Kanalorgane und Freie Neuromasten beim Aal (*Anguilla anguilla*): Spontanktivität und Reaktion auf laminare Strömungsreize aus unterschiedlichen Richtungen.
Diplomarbeit der Universität München.
- Roth, A. (1971): Zur Funktionsweise der Elektrozep-toren in der Haut von Welsen (*Ictalurus*): Der Einfluß der Ionen im Süßwasser.
Z. Vergl. Physiol. 75: 303-322.
- Russel, I.J., Sellick, P.M. (1978): Intracellular studies of hair cells in mammalian cochlea.
J. Physiol. 284: 261-290.
- Russel, I.J., Sellick, P.M. (1976): Measurements of potassium and chloride ion concentrations in the cupulae of the lateral line of *Xenopus laevis*.
J. Physiol. 257: 245-255.

- Reed, P.W., Lardy, H.A. (1972): Antibiotic A 23187 as a probe for the study of calcium and magnesium function in biological systems. In: The role of membranes in metabolic regulation (E. Myron, R. Mehlmann ed.) Acad. Press, New York, London: 111-131.
- Sand, O., Ozawa, S., Hagiwara, S. (1975): Electrical and mechanical stimulation of hair cells in the mudpuppy. J. Comp. Physiol. A 102: 13-26.
- Sand, O. (1975): Effects of different ionic environments on the mechano-sensitivity of lateral line organs in the mudpuppy. J. Comp. Physiol. A 102: 26-40.
- Sellick, P.M., Johnstone, M.B. (1975): Production and role of inner ear fluid. Progr. Neurobiol. 5: 337-362.
- Shiozawa, K., Yanagisawa, K. (1979): Effects of neomycin on the lateral line organ of the mudpuppy. Proc. Jap. Acad. 55, ser.B: 374-379.
- Teeter, J.H., Bennett, M.V.L. (1981): Synaptic transmission in the ampullary electroreceptor of the transparent catfish *Kryptopterus*. J. Comp. Physiol. 142: 371-377.
- Weihe, E., Hartschuh, W., Metz, J., Brühl, V. (1977): The use of ionic lanthanum as a diffusion tracer and as a marker of calcium binding-sites. Cell. Tiss. Res. 178: 285-302.

- Weiss, T.F., Mulroy, M.J., Altmann, D.W. (1974):
Intracellular responses to acoustic clicks
in the inner ear of the alligator lizard.
J. Acoust. Soc. Amer. 55: 606-619.
- Weiss, G.B. (1974): Cellular pharmacology of lanthanum.
Ann. Rev. Physiol. no:6597 343-354.
- Wersäll, J., Flock, A. (1964): Suppression and restoration of microphonic output from the lateral line organ after local application of streptomycin.
Life Sci. 3: 1151-1155.

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für
Zoologie der Ludwig-Maximilian-Universität angefertigt.

Herrn Prof.Dr.Roth danke ich für die Erstellung des
Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und
für die Diskussion der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr.R.Weiler
der durch seinen persönlichen Einsatz die Fertig-
stellung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Frau Angela Helmrich danke ich für histologische
Arbeiten, Herrn Georgacarakos für die Bereitstellung
von Geräten und hilfreiche Diskussionen, sowie
meiner Schwester Frau Susanne Schöninger für Schreib-
arbeiten.

Lebenslauf:

05.12.52 geboren in Salzburg

Eltern: Dr.med. Werner Baumann, Arzt

Carola Baumann, geb. von Schreck

1959-1963 Besuch der Volksschule Bad Reichenhall

1963-1972 Besuch des mathematisch-naturwissen-
schaftlichen Gymnasiums Bad Reichenhall
Abschluß mit der Reifeprüfung

1972-1973 Ausbildung als Kosmetikerin an einer
Kosmetikschule in München.
Abschluß mit dem Diplom

1973-1978 Biologie-Studium an der Ludwig-Maximilian-
Universität München
Abschluß mit dem Diplom im WS 1977/78

1978-1979 Diplomarbeit am Zoologischen Institut
der LMU München mit dem Thema: "Unter-
suchungen zum Rezeptormechanismus der
Seitenlinienorgane des Aales (*Anguilla
anguilla*)"

1980-1983 Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfs-
kraft für Forschung und Lehre im Zoolo-
gischen Institut der LMU München

1979-1985 Anfertigung der vorliegenden Dissertation
seit Feb 1985: angestellt in der Landesanstalt für
Wasserforschung, Kaulbachstr. 37

